

**Vergleichende Untersuchungen
über die Proteinsynthese in zellfreien Systemen
aus Rattenleber und Rattenembryonen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
im Fachbereich Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Gero Wiedemann
aus Berlin

1992



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553616_0006

**Vergleichende Untersuchungen
über die Proteinsynthese in zellfreien Systemen
aus Rattenleber und Rattenembryonen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
im Fachbereich Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Gero Wiedemann
aus Berlin



Referent: Prof. Dr. D. Neubert

Korreferent: Prof. Dr. G. Schenck

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Februar 1972

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

Meiner Pflegemutter, Frau Johanna Hecht,

in Dankbarkeit

I n h a l t

	<u>Seite</u>
<u>A. Einleitung</u>	1
<u>B. Problemstellung</u>	1
<u>C. Allgemeines über Protein-Biosynthese</u>	2
<u>D. Ergebnisse und Diskussion eigener Versuche</u>	10
1. Untersuchung einiger Parameter, die die Aktivität des Proteinsynthese-Systems beeinflussen könnten	
1.) Art des Homogenisierens	10
2.) Einfluß der Geschwindigkeit der Aufarbeitung	11
3.) Technik der Isolierung von Ribosomen/Polysomen	14
4.) Einfluß des "Hilfssystems" aus Leber- bzw. Gehirn-Hyaloplasma	17
5.) Einfluß von SH-Substanzen	20
6.) Einfluß des Einfrierens in flüssigem Stickstoff auf die Fähigkeit von Mikrosomen bzw. Ribosomen zur Proteinsynthese	20
II. Proteinsynthese in embryonalem Rattengewebe (Vergleich mit Leber-Gewebe)	22
1.) Vergleichende Untersuchungen verschiedener Parameter mit Leber- und embryonalem Gewebe (Aktivität von Mikrosomen sowie Ribosomen/Polysomen ohne und mit Poly-U Zusatz)	
1,1 pH-Abhängigkeit	22
1,2 Abhängigkeit von der Magnesium-Konzentration	25
1,3 Abhängigkeit von der ATP-Konzentration	30
1,4 Einfluß eines ATP-regenerierenden-Systems	30
1,5 Abhängigkeit von der Menge Pyruvat-Kinase im Versuchsansatz	33
1,6 Abhängigkeit von der GTP-Konzentration	38
1,7 Abhängigkeit von der KCl-Konzentration	38
1,8 Abhängigkeit von der NH_4Cl -Konzentration	42
1,9 Zeitabhängigkeit der Proteinsynthese mit Mikrosomen und Ribosomen von Leber und 14 Tage Embryonen	46
1,10 Fermentabhängigkeit der Proteinsynthese in Mikrosomen und Ribosomen von Leber und 14 Tage Embryonen	48

	<u>Seite</u>
2.) Versuche mit embryonalem Gewebe in verschiedenen Stadien der Entwicklung	48
3.) Versuche mit Homogenaten	52
III. Versuche zur Isolierung von Polysomen-Fraktionen im linearen Saccharose-Gradienten	54
IV. Vergleichende Untersuchungen mikrosomaler und ribosomaler Präparationen aus Leber und embryonalem Gewebe vor und nach Vorinkubation unter Verwendung eines synthetischen "messengers"	58
1.) Untersuchungen von Zellfraktionen ohne Vorinkubation	61
2.) Untersuchungen mit Zellfraktionen nach Vorinkubation (Entfernung des endogenen "messengers")	63
<u>E. Material und Methoden</u>	65
I. Benutzte Substanzen	65
II. Benutzte Präparationsmedien	65
III. Versuchstiere	66
IV. Technik der Isolierung der Zellfraktionen	67
1.) Hyaloplasma-Isolierung	67
2.) Isolierung der Leber-Mikrosomen	67
3.) Isolierung der Leber-Ribosomen/Polysomen	68
4.) Isolierung der Embryonen-Ribosomen/Polysomen und der Embryonen-Mikrosomen	69
5.) Isolierung der Mikrosomen bzw. Ribosomen/Polysomen aus anderen Organen	69
6.) Isolierung der Embryonen-Homogenate	69
7.) Gewinnung der Homogenate aus den Organen Leber, Niere, Herz, Thymus, Lunge, Pankreas, Gehirn und Milz von Muttertieren bzw. Tumor-Homogenate	69
8.) Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation	70
V. Ansatz zur Messung der Proteinsynthese	70
VI. Durchführung der Inkubation	73
VII. Vorinkubation von Mikrosomen oder Ribosomen	74
VIII. Bestimmung der Radioaktivität	74
IX. Bestimmung der Zählausbeute	74
X. Berechnung der Einbauraten	76

	<u>Seite</u>
XI. RNA-Bestimmung	76
XII. DNA-Bestimmung	77
<u>F. Schlußfolgerungen</u>	78
<u>G. Zusammenfassung</u>	81
<u>H. Literaturverzeichnis</u>	84
<u>J. Lebenslauf</u>	99

A. Einleitung

=====

Die Regulation von Stoffwechselvorgängen ist in einer Zelle in erster Linie an die Funktion von Fermentsystemen gebunden. Da Fermente immer Proteine darstellen, kommt der Proteinsynthese in einer Zelle eine wichtige Aufgabe zu.

Auch in einer nicht-wachsenden Zelle werden laufend Proteine synthetisiert - als Ersatz für Polypeptide, die zur gleichen Zeit abgebaut werden. Jedes Protein hat eine bestimmte "Lebenszeit", die - je nach dem Gewebe oder der Art des Proteins - sehr verschieden lang sein und Stunden bis Monate betragen kann. Die Regulation der Synthese spezifischer Proteine und eine ausgeglichene Balance der verschiedenen Komponenten stellen daher ein besonderes Charakteristikum jeder lebenden Zelle dar.

B. Problemstellung

=====

In unserer Arbeitsgruppe haben wir uns seit mehreren Jahren mit den biochemischen Besonderheiten des embryonalen Säugetiergewebes beschäftigt. Während der embryonalen Entwicklung findet ein außerordentlich schnelles Wachstum statt, verbunden mit einer Fülle von Differenzierungsvorgängen, die zur Anlage und Ausbildung der verschiedenen Organsysteme führen.

Es war die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, die Kapazität embryonalen Säugetiergewebes zur Proteinsynthese an zellfreien Systemen zu untersuchen, um einen Einblick in die Vorgänge der Translation zu erhalten. Die Untersuchungen sollten als Grundlage für spätere Untersuchungen dienen, den Einfluß von embryotoxischen Substanzen auf diesen Stoffwechselweg näher zu analysieren.

Im wesentlichen wurden zwei Fragestellungen untersucht:

- 1.) Benötigen zellfreie Systeme aus embryonalem Gewebe die gleichen Co-Faktoren für eine optimale Proteinsynthese wie entsprechende

Systeme aus erwachsenen Geweben?

- 2.) Lassen sich Unterschiede in der Kapazität zur Proteinsynthese in verschiedenen Stadien der embryonalen Entwicklung (Phase der Organogenese) nachweisen?

C. Allgemeines über Protein-Biosynthese

=====

Da die vorliegende Arbeit Besonderheiten der Protein-Biosynthese im embryonalen Säugetiergewebe zum Thema hat, soll zuerst ein allgemeiner Überblick über die Mechanismen der Protein-Biosynthese, soweit sie heute bekannt sind, gegeben werden. Diese Grundzüge der Synthese von Polypeptiden wurden vor allem an Bakterien studiert, da bakterielle Systeme in vieler Hinsicht experimentell leichter zugänglich sind. Deshalb gilt das im folgenden Gesagte in erster Linie für die Protein-Biosynthese in zellfreien Bakteriensystemen. Es gibt zwar - in den Grundmechanismen - viele Gemeinsamkeiten zwischen der Protein-Biosynthese in Bakterien und der in Warmblüter-Zellen, die Reaktionsabläufe in diesen beiden Systemen weisen jedoch andererseits auch erhebliche Unterschiede auf.

Allein schon die unterschiedliche Größe der Ribosomen - 70 S bzw. 80 S - und deren Untereinheiten weist auf Unterschiede in der Funktion hin. Diese verschiedene Funktion äußert sich ganz besonders eindrucksvoll in Unterschieden der Hemmbarkeit der Protein-Biosynthese durch einige Antibiotika. Einen guten Überblick über die Mechanismen der Protein-Biosynthese - vor allem in Bakterien - geben neben anderen folgende Autoren:

CAMPBELL and SARGENT (1967)

DAVIDSON (1969)

DeMAN and NOORDYN (1969)

KONINGS (1969)

LENGYEL and SÖLL (1969)

LEHNINGER (1970)

CASPERSSON und BRACHET kamen vor ca. 30 Jahren aufgrund histochemischer Befunde zu dem Schluß, daß die Proteinsynthese in der Zelle an die

Gegenwart von RNA gebunden sei (CASPERSSON 1941; BRACHET 1942). Bald darauf entdeckte man, daß ein großer Teil der RNA mit einer Klasse von submikroskopischen Partikeln - den "Mikrosomen" - lokalisiert ist, die aus Gewebehomogenaten als Bruchstücke des endoplasmatischen Retikulum durch Zellfraktionierung mit Hilfe der Ultrazentrifugation gewonnen werden können (CLAUDE 1943; BRACHET and JEENER 1944). HULTIN (1950) konnte in Kükenlebern nach Gabe von ^{15}N -Glycin in-vivo einen raschen Einbau der radioaktiv markierten Aminosäure in Proteine nachweisen. 1954 zeigten ZAMECNIK und KELLER, daß auch isolierte Leber-Mikrosomen radioaktiv markierte Aminosäuren in Protein einbauen, wenn außerdem die lösliche Zellfraktion und ein kontinuierlich regenerierendes System für Nucleosid-Triphosphate vorhanden sind.

Erst die Verwendung radioaktiv markierter Aminosäuren gestattet, deren Weg bis zum Einbau in die Polypeptide zu verfolgen, und die komplizierten Vorgänge der Protein-Biosynthese genauer zu analysieren.

Die Aminosäure-Sequenz sämtlicher in der Zelle vorkommender Proteine ist durch die Nucleotid-Sequenz in der DNA genetisch festgelegt. Diese genetische Information wird aber nicht direkt zur Bildung eines spezifischen Proteins benutzt. Als Informationsüberträger bedient sich die Zelle einer bestimmten RNA-Fraktion, der "messenger"-RNA. Diese wird an der DNA des Zellkernes aus Nucleotidbausteinen synthetisiert und erhält dabei die komplementäre Nucleotid-Sequenz der DNA als Information. Diesen Schritt der Informationsübertragung bezeichnet man als Transkription. Die "messenger"-RNA wird - in noch nicht vollständig geklärter Weise - aus dem Kern ausgeschleust und sie heftet sich an die cytoplasmatischen Ribosomen, den eigentlichen Ort der Proteinsynthese. Dort fungiert sie als Matrize für die zu synthetisierenden Proteine, indem sie die Reihenfolge der miteinander zu verknüpfenden Aminosäuren determiniert. Dies wird als Translation der Information bezeichnet. Die Translation der messenger-RNA erfolgt von ihrem 5'- zu ihrem 3'-Ende (SALAS et al. 1965; TERZAGHI et al. 1965).

"Ribosomen": Der Name wurde von ROBERTS (1958) geprägt, um den eigentlichen proteinsynthetisierenden, elektronendichten Anteil der "rauen" Mikrosomen-Fraktion vom Membranmaterial zu unterscheiden. Diese elektro-

nendichten Partikel haben einen Durchmesser von ca. 20 μ m und sie finden sich in allen Typen lebender Zellen. Bei den Eukaryonten ist der Hauptteil der Ribosomen im Cytoplasma lokalisiert, und zwar "frei" oder gebunden an das endoplasmatische Retikulum (BENEDETTY et al. 1966).

Neuere Untersuchungen haben jedoch ergeben, daß sich Ribosomen aber auch im Zellkern und in anderen Zellorganellen, wie in den Mitochondrien (RENDI 1959) oder auch den Chloroplasten nachweisen lassen.

Die Ribosomen bestehen generell aus einer größeren und einer kleineren Untereinheit. Beide enthalten Protein und RNA. Ribosomen von Prokaryonten enthalten zwischen 60 und 65 % ribosomale RNA und ca. 35 bis 40 % Protein, die von Eukaryonten ca. 50 % ribosomale RNA und 50 % Protein. Das vollständige Ribosom und die Untereinheiten werden definiert aufgrund ihres Sedimentationskoeffizienten (angegeben in Svedberg-Einheiten = "S"). Nach den Sedimentationskoeffizienten kann man die Ribosomen in zwei Klassen unterteilen (TAYLOR and STORCK 1964):

- a) Ribosomen von Bakterien, blau-grünen Algen, Chloroplasten und Mitochondrien haben einen S-Wert von ca. 70 S,
- b) die Ribosomen von grünen Pflanzen, Tieren, Hefen und einer Anzahl Pilze einen Sedimentationskoeffizienten von ungefähr 80 S.

Die Ribosomen sind stabil in Lösungen mit relativ hoher Mg^{++} -Konzentration und zerfallen in ihre Untereinheiten, wenn die Mg^{++} -Konzentration drastisch reduziert wird. Die 70 S Ribosomen von E.coli haben ein Molekulargewicht von ca. $2,7 \times 10^6$ und zerfallen bei einer Mg^{++} -Konzentration unter 0,5 mM in eine 30 S Untereinheit (Molekulargewicht ca. $0,9 \times 10^6$), und eine 50 S Untereinheit (Molekulargewicht ca. $1,8 \times 10^6$). Die Sedimentationskonstanten der Säugetier-Ribosomen schwanken zwischen 73 und 80 S (Molekulargewicht ca. 4×10^6) und haben Untereinheiten von 30 bis 40 S und 50 bis 60 S (Molekulargewicht einer 40 S Untereinheit ca. $1,3 \times 10^6$, Molekulargewicht einer 60 S Untereinheit ca. $2,7 \times 10^6$) (DAVIDSON 1969).

Während der Proteinsynthese werden die Ribosomen mit einem m-RNA-Strang verknüpft und wandern schrittweise um jeweils ein Triplet-Codon vom 5'

zum 3' Ende an der m-RNA entlang. 1962 hatten WARNER et al. die Hypothese aufgestellt, daß die Zellproteine nicht von einzelnen Ribosomen, die isoliert arbeiten, produziert werden, sondern von Polyribosomen in geordneter Anordnung. Sie stützten sich dabei auf die Entdeckung, daß der Einbau von radioaktiv markiertem Leucin sich nur in Polyribosomen, nicht aber in Monosomen zeigt (WARNER et al. 1963). Da die Anzahl der Ribosomen in einem Polysomen-Aggregat ungefähr proportional der Anzahl der Aminosäure-Reste der Polypeptidketten ist, wurde daraus geschlossen, daß die m-RNA gleichzeitig von mehreren Ribosomen "gelesen" wird, die sich in einiger Entfernung voneinander bewegen. Dabei produziert jedes Ribosom eine vollständige Peptidkette.

Die Hämoglobin-Peptid-Ketten, die ungefähr 150 Aminosäure-Reste enthalten, werden codiert durch ein m-RNA Molekül, welches $3 \times 150 = 450$ Mononucleotide besitzt. Da jedes 80 S Reticoluzysten-Ribosom einen Durchmesser von ungefähr $220 \text{ \AA}$ hat, ist zwischen den einzelnen Monosomen ein Abstand. Isolierte Reticoluzysten-Ribosomen enthalten ca. 6 Monosomen, so daß die durchschnittliche Entfernung zwischen den Ribosomen ungefähr $30 \text{ \AA}$ beträgt. Polysomen in E.coli wurden mit bis zu 40 Monosomen pro Komplex (GILBERT 1963; STAEHELIN et al. 1963; SCHAECHTER 1963; KIRO and RICH 1964) und in Leber bis zu 20 Monosomen pro Komplex beschrieben (NOLL et al. 1963; MUNRO et al. 1964; WETTSTEIN et al. 1963).

Die Proteinsynthese läßt sich in folgende Schritte unterteilen:

- 1.) Als erstes müssen die in der Zelle in freier Form vorliegenden Aminosäuren "aktiviert" werden. Die hierfür notwendige chemische Energie liefert Adenosin-Triphosphat, welches mit einer Aminosäure unter Eliminierung von Pyrophosphat ein gemischtes Carbonsäure-Phosphorsäure-Anhydrid bildet. Katalysiert wird diese Reaktion durch ein für jede der 20 Aminosäuren spezifisches Enzym (Aminoacyl-t-RNA-Synthetasen).
- 2.) Die entstandene energiereiche Aminoacyl-Adenylat-Verbindung reagiert im folgenden Schritt mit einer besonderen RNA-Form, der für jede Aminosäure spezifischen "transfer"-RNA (t-RNA). Dabei wird die

Aminosäure an die t-RNA angelagert, indem sie esterartig mit dem C-3' des terminalen Adenosin verknüpft wird. Diese Reaktion wird ebenfalls enzymatisch katalysiert. Transfer-Ribonucleinsäuren sind Polynucleotide, bestehend aus ungefähr 70 bis 80 Nucleotiden. Am 5'-Hydroxylende steht in der Regel ein Guanin-Nucleotid, am freien 3'-Hydroxylende befindet sich die Nucleotid-Sequenz mit den Basen Cytoson-Cytoson-Adenin. Jede t-RNA besitzt ein spezifisches Basen-Triplet - Anticodon genannt - welches die zu einem messenger-RNA-Codon komplementären Basen enthält. Die zu dem jeweiligen m-RNA-Codon passende Aminosäure wird mit Hilfe dieses "Anticodons" ausgewählt (HOLLEY et al. 1965). Die Aufgabe der t-RNA ist es also, die Aminosäuren an die m-RNA und an das Ribosom in typischer Weise zu fixieren.

Der genetische Code

Der "genetische Code", den die "messenger"-RNA aufgeprägt bekommen hat und der die Aminosäure-Sequenz bestimmt, ist durch die grundlegenden Arbeiten von NIRENBERG, MATTHAEI und OCHOA entschlüsselt worden (NIRENBERG and MATTHAEI 1961; OCHOA 1964). Wir haben es mit einem sogenannten "Triplet-Code" zu tun, da jeweils eine Aminosäure durch drei aufeinanderfolgende Basen der m-RNA bestimmt wird.

Die Frage, wie die Proteinsynthese bei E.coli eingeleitet wird, konnte geklärt werden, nachdem MARCKER und SANGER (1964) N-formylmethionyl-t-RNA entdeckt hatten. Durch Experimente mit natürlicher und synthetischer m-RNA wurde gezeigt, daß N-formylmethionyl-t-RNA als Ketten-initiator fungiert und daß Adenosin-Uridin-Guanosin (AUG) und Guanosin-Uridin-Guanosin (GUG) die Initiator-Condots sind (ADMAS and CAPECCHI 1966; CAPECCHI 1966; CLARK and MARCKER 1966; VINUELA et al. 1967; WEBSTER et al. 1966; MIOVIC and PIZER 1968).

Mechanismus der Peptidknüpfung am Ribosom

Die Verknüpfung der einzelnen Aminosäuren zu einem Protein erfolgt an den Ribosomen - nach unseren heutigen Kenntnissen - folgendermaßen:

1.) Bindung: Die "messenger"-RNA bindet sich an eine 30 S "subunit" (EISENSTADT and BRAWERMAN 1967; GODSON and SINSHEIMER 1967) unter Mit-

wirkung eines spezifischen Protein-Faktors F_3 (EISENSTADT and BRAWERMAN 1966; REVEL and GROS 1966; REVEL et al. 1968; IWASAKI et al. 1968). Dabei kommt es wohl zuerst zu einer Bindung zwischen dem Faktor F_3 und der m-RNA (BROWN and DOTY 1968). Daneben bewirken die sogenannten Initiationsfaktoren F_1 und F_2 , daß sich bei Gegenwart von GTP F-met-t-RNA_f an eine 30 S "subunit" bindet (ALLENDE and WEISBACH 1967; ANDERSON et al. 1967; GUTHRIE and NOMURA 1968; HERSHEY and THACH 1967; HILLE et al. 1965; LEDER and NAU 1967; LUCAS-LENARD and LIPMAN 1967; MUKUNDAN et al. 1968; NOMURA and LOWRY 1967; SALAS et al. 1967). Erst wenn dieser sogenannte Initiationskomplex, bestehend aus m-RNA und AUG oder GUG am 5' terminalen Ende, einer 30 S ribosomalen Untereinheit, den Initiationsfaktoren F_1 und F_2 und F-met-t-RNA vorliegt (CLARK and MARCKER 1966; GHOSH et al. 1967; NOMURA et al. 1967), wird eine große 50 S Untereinheit angelagert und so ein vollständiges 70 S-Ribosom hergestellt.

Die F-met-t-RNA wird wahrscheinlich zuerst an die hypothetische A-site (aminoacyl-site) des Ribosomes gebunden (GHOSH et al. 1967; KOLAKOFSKY et al. 1968a; KONDO et al 1968; SARKAR and THACH 1968). Danach wird die F-met-t-RNA an die P-site (peptidyl-site), eine weitere hypothetische "site" am Ribosom transportiert. Es gibt Hinweise dafür, daß bei diesem Vorgang GTP in GDP und Orthophosphat gespalten wird (KOLAKOFSKY et al. 1968b).

2.) Ketten-Verlängerung (chain elongation): An die unbesetzte A-site des Ribosoms kann nun eine Aminoacyl-t-RNA gebunden werden, die von dem Codon der messenger-RNA ausgewählt wird, welches der 3' Seite des Initiator-Codons benachbart ist (KAJI and KAJI 1963; NAKAMOTO and KOLAKOFSKY 1966; NIRENBERG and LEDER 1964). Dafür werden GTP und ein löslicher Faktor T (der sich in einen Hitze-labilen Faktor Tu und einen Hitze-stabilen Faktor Ts trennen läßt) benötigt (ERTEL et al. 1968; LOEHR and KELLER 1968; RAVEL 1967; SKOULTCHI et al. 1968). In Gegenwart von Aminoacyl-t-RNA bilden GTP, Tu und Ts einen Komplex (LUCAS-LENARD and LIPMAN 1966; RAO and MOLDAVE 1967; LUCAS-LENARD and HAENNI 1968;

ALLENDE et al. 1967; GORDON 1968). Bei diesem Schritt scheint GTP in GDP und Pyrophosphat gespalten zu werden (ONO et al. 1969). Nachdem die Aminoacyl-t-RNA an den Initiationskomplex gebunden ist, kann die erste Peptidbindung, katalysiert durch die Ribosomen-gebundene Peptidyl-Transferase geknüpft werden. Die Peptidyl-Transferase ist ein Bestandteil der 50 S Untereinheit des Ribosoms (MONRO 1967). Bei Knüpfung der Peptidbindung wird an der Formylmethionyl-t-RNA die Esterbindung zwischen C-3'-Hydroxyl- und Carboxylgruppe gelöst, so daß letztere mit der freien NH₂-Gruppe der Aminoacyl-t-RNA eine Peptidbindung eingehen kann.

3.) Translokation: Damit nun eine weitere, mit einer Aminosäure beladene t-RNA an das Ribosom gebunden werden kann, muß die Aminoacyl-t-RNA mit der wachsenden Peptidkette von der A-site zur P-site transportiert werden. Diese Translokation wird katalysiert durch einen Faktor G (ERBE and LEDER 1968) und benötigt wiederum GTP, welches zu GDP und Pyrophosphat gespalten wird (BROT et al. 1968; ERBE and LEDER 1968; ERTEL et al. 1968; HAENNI and LUCAS-LENARD 1968; PESTKA 1968; TANAKA et al. 1968). Gleichzeitig bewegt sich das Ribosom um ein Triplet an der messenger-RNA in der 5' zur 3'-Richtung weiter (WATSON 1964).

Nach der Translokation werden weitere Aminoacyl-Reste an die Formylmethionyl-t-RNA gebunden, indem der beschriebene Zyklus: Aminoacyl-t-RNA-Bindung an die A-site des Ribosoms, Knüpfung der Peptidbindung und Translokation so oft wiederholt werden, bis das Signal zur Kettenbeendigung erscheint. Die wachsende Polypeptidkette, die während der Kettenverlängerung jeweils mit einer t-RNA verbunden ist, löst sich nach ihrer Vollendung vom Ribosom ab. Dieser Vorgang wird als "chain-termination" bzw. Peptid-Ablösung bezeichnet (GANOZA 1966; KÖSSEL 1968; LAST et al. 1967; TAKANAMI et al. 1965; ZINDER et al. 1966). Ausgelöst wird er, wenn ein sogenanntes Terminator-Codon der m-RNA, die A-site des Ribosoms erreicht. Uridin-Adenosin-Adenosin (UAA), Uridin-Adenosin-Guanosin (UAG) und Uridin-Guanosin-Adenosin (UGA) (sogenannte "nonsense-Codons") fungieren mindestens in einigen Bakterien-Systemen offenbar als Terminator-Codons (BRENNER et al. 1967; TAKANAMI et al. 1965; BRENNER et al. 1965; SAMBROCK et al. 1967; WEIGERT and GAREN 1965; WEIGERT et al. 1967). Außerdem wird ein "protein-release-factor" R benötigt, der die Hydrolyse der Esterbindung zwischen Polypeptid und t-RNA katalysiert.

Dieser kann in zwei Komponenten R_1 und R_2 aufgetrennt werden. R_1 ist dabei für die Termination durch UAA oder UAG spezifisch, während es R_2 für UAA oder UGA ist (CAPECCHI 1967; CASKEY et al. 1968; SCOLNICK et al. 1968). Es gibt mehrere Hinweise, daß die Ribosomen als freie 70 S Ribosomen den Komplex verlassen (ALGRANATI et al. 1969; KOHLER et al. 1968; MacDONALD and YEATER 1968; RON et al. 1968) und anschließend durch einen Dissoziationsfaktor in ihre Untereinheiten zerlegt werden (SUBRAMANIAN et al. 1968).

Hemmung bestimmter Schritte des Proteinsynthese-Vorgangs durch Antibiotika:

Die Hemmung der Proteinsynthese durch Chemotherapeutika gibt ein gutes Modell, um Wirkungsmechanismen der Proteinsynthese zu studieren. Mit Hilfe von Antibiotika gelang es, nähere Einblicke in die einzelnen Schritte der Proteinsynthese zu gewinnen. Je nachdem, ob diese Hemmstoffe die Proteinsynthese

- a) blockieren (Chloramphenicol)
- b) eine falsche Ablesung provozieren (Streptomycin) oder die Synthese
- c) unterbrechen (Puromycin),

kann man sie in verschiedene Gruppen unterteilen (DeMAN and NOORDYN 1969).

- a) Chloramphenicol, Sparsomycin, Gangerotin und Aureomycin gehören zur Gruppe von Hemmstoffen, die die Synthese blockieren, indem sie sich an die 50 S Untereinheit von 70 S-Ribosomen binden. Aureomycin soll sich mit dem Ribosom so verbinden, daß die Bindungsseite für die Aminoacyl-t-RNA blockiert wird (SUAREZ and NATHANS 1965). Die anderen drei Antibiotika stören den Peptidbindungsschritt wahrscheinlich durch Hemmung der Peptidsynthetase, da sie Hemmstoffe der Puromycin-induzierten Abspaltung der Polypeptide von den Ribosomen sind (MONRO and VAZQUEZ 1967; GOLDBERG and MITSUGI 1967a; GOLDBERG and MITSUGI 1967b). Im Gegensatz zum Chloramphenicol hemmt Cycloheximid (das auch in diese Gruppe a gehört) die Proteinsynthese an 80 S Ribosomen von Warmblütern, nicht aber die an 70 S Ribosomen von Prokaryonten.

Eine andere Gruppe von Antibiotika hemmt die Proteinsynthese durch Bindung an die 30 S Untereinheit. Dazu gehören Erythromycin und Spectinomycin (OLEINICK und CORCORAN 1967; DAVIES et al. 1965).

- b) Streptomycin und verwandte Antibiotika verursachen Ablesefehler bei der Translation (SPOTTS und STANIER 1961). Streptomycin wird an die Bindungsorte der m-RNS an der 30 S Untereinheit angelagert. Dort verursacht der Hemmstoff ein "falsches Ablesen" am m-RNA-Code. Die Veränderungen des messenger-Code beruhen in einer Verschiebung des Aminosäuretriplets um eine oder mehrere Basen (DAVIES et al. 1964). Das führt zu einer falschen Codon-Anticodon-Bindung (LEON and BROCK 1967). Neomycin, Kanamycin, Gentamicin u.ä. wirken in gleicher Weise, nur daß wahrscheinlich ein anderes ribosomales Protein beteiligt ist.
- c) Puromycin unterbricht die Proteinsynthese, indem es die wachsende Peptidkette vom Ribosom freisetzt. Dies ergibt sich aus seiner molekularen Struktur (YARMOLINSKY and DeLaHABA 1959): Als Analoges der Phenylalanin- bzw. Tyrosin-t-RNA verdrängt es diese bei der Peptidsynthese. Es kann zwar eine Peptidbindung mit der Aminosäure der vorangehenden t-RNA eingehen, mit der nachfolgenden Aminosäure ist aber keine Peptidbindung mehr möglich, so daß die bis dahin gebildete Peptidkette zusammen mit dem Puromycin vom Ribosom freigesetzt wird (NATHANS 1964; GILBERT 1963).

D. Ergebnisse und Diskussion eigener Versuche

=====

1. Untersuchung einiger Parameter, die die Aktivität des Proteinsynthesesystems beeinflussen könnten

1. Art des Homogenisierens

Bereits 1954 fand TARVER, daß Homogenisieren eines Gewebes die Fähigkeit zum Einbau von Aminosäuren in Proteine reduziert. Ein Leberhomogenat baut 20 % weniger Radioaktivität ein als Leberschnitte.

ZAMECNIK und KELLER (1954) sowie GANOZA et al. (1965) untersuchten die optimalen Homogenisationsbedingungen für Rattenleber. Auch wir konnten in einem Doppelversuch (siehe Tabelle 1) zeigen, wie empfindlich unser Proteinsynthese-System auf Änderungen der Homogenisationsbedingungen reagiert und wie genau die Standard-Bedingungen eingehalten werden müssen, um mögliche Fehlerquellen auszuschließen.

Aus der Tabelle 1 geht hervor, daß auch die Anzahl der Ab- und Aufbewegungen beim Homogenisieren von Bedeutung ist. Ein zu intensives Homogenisieren kann die Kapazität des Einbaus von Aminosäuren in Proteine durchaus vermindern. GANOZA et al. (1965) geben u.a. an, daß der Effekt des Homogenisator-"Spiels" eines Glas-Potter-Elvehjem Homogenisators auf den Einbau von Aminosäuren durch Rattenleber-Mikrosomen derart ist, daß ein maximaler Einbau erzielt wird, wenn die Differenz der Durchmesser von Pistill und Homogenisatorrohr 0,93 mm beträgt. Sind es nicht 0,93 mm, sondern nur 0,25 mm oder aber 1,15 mm, so sollen die Einbauraten um ca. 50 % niedriger sein. Wir homogenisierten routinemäßig mit 7 Ab- und Auf-Bewegungen des Pistills bei 1200 U.p.M. und benützten dafür einen Potter-Elvehjem-Plexiglas-Homogenisator, dessen Differenz der Durchmesser von Pistill und Homogenisatorrohr 0,9 mm betrug.

2. Einfluß der Geschwindigkeit der Aufarbeitung

Die Aminosäure-Einbauraten in Protein von Zellfraktionen sind in hohem Maße abhängig von der jeweiligen Aufarbeitungsgeschwindigkeit. Wie Tabelle 2 zeigt, können unterschiedliche Einbauraten resultieren. Dies hängt in erster Linie offenbar davon ab, wie schnell das Gewebe von 37° C auf - möglichst 0° C - abgekühlt wird.

Die Ergebnisse einiger systematischer Versuche zu diesem Problem sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Wie aus den Daten zu ersehen ist, ist es nicht günstig (1. Versuch), die Organe sogleich nach dem Herauspräparieren zu homogenisieren. Offenbar besitzen die Organe noch annähernd Körpertwärme, so daß das Homogenat (1 Teil Gewebe fast 37° C + 3 Teile eiskalte Saccharose-Lösung !) zunächst eine zu hohe Temperatur aufweist und zu langsam abkühlt.

Tabelle 1 Einfluß des Homogenisierens auf den Einbau von ^{14}C -
Phenylalanin in Proteine durch Leber-Mikrosomen

Beispiel von Versuchen, die an zwei verschiedenen Tagen durchgeführt wurden. Es wurde ein definiertes Homogenat (1 Teil Leber + 3 Teile Mg^{++} - Saccharose-Medium) angefertigt. Die Zahlen bezeichnen dpm/ μg RNA.

Inkubationszeit: 7 Minuten

Versuchsbedingungen wie im Abschnitt "Material und Methoden" angegeben.

	ml Leber-Mikrosomen pro 0,5 ml Ansatz	mit 7 x Ab- und Auf homogenisiert	mit 10 x Ab- und Auf homogenisiert
		Einbau von ^{14}C -Phe in vitro dpm/ μg RNA	dpm/ μg RNA
1. Versuch	0,05	26,5	20,4
	0,1	24,2	20,5
=====			
2. Versuch	0,05	26,7	23,1
	0,1	25,2	22,1

Tabelle 2 Einfluß der Aufarbeitungs-Zeit auf den Einbau von
¹⁴C-Phe in Proteine (Leber-Mikrosomen)

In den Versuchen 1 und 2 wurden die Lebern sofort nach der Dekapitation der Tiere herauspräpariert und vor dem Homogenisieren

im Versuch 1 - die Lebern 30 Sekunden in eiskalte 0,32 M Saccharose getaucht,

im Versuch 2 - die Lebern 30 Minuten zwischen Eiskörner gelagert.

Im Versuch 3 - wurden die Lebern 30 Minuten im dekapitierten Tier belassen und dann erst herauspräpariert und wie unter 2. beschrieben weiterverarbeitet.

Die Zahlen geben an: dpm/µg RNA

Inkubationszeit: 7 Minuten

Versuchsbedingungen wie im Abschnitt "Material und Methoden" angegeben.

ml Leber-Ms pro 0,5 ml Ansatz	1. Versuch dpm/µg RNA	2. Versuch dpm/µg RNA	3. Versuch dpm/µg RNA
0,05	18,9	31,6	6,2
0,1	17,2	32,9	5,1

Wie aus der Tabelle weiter zu ersehen ist, wurde im Versuch 3 die Aminosäure-Einbaurrate in Protein auf 1/6 der Rate des Versuchs 2 gesenkt. Dies ist wohl so zu erklären, daß der "messenger" bei der eingetretenen Hypoxie und der relativ hohen Temperatur schnell abgebaut wird. Hierfür sind wahrscheinlich RNasen verantwortlich, die auch zu einer partiellen Degradation der Ribosomen führen können - wie eine Verminderung des RNA-Gehaltes in der Präparation zeigt. Um diese mögliche Fehlerquelle auszuschalten, die besonders bei großen Tiergruppen - wie wir sie häufig zu verarbeiten hatten - auftritt, wurden in den folgenden Versuchen die jeweils benötigten Organe routinemäßig sofort nach der Dekapitation der Tiere herauspräpariert. Anschließend wurden die Organe dann sofort zwischen Eiskörner gelegt, wo sie 30 Min. bis zum Homogenisieren verblieben.

3. Technik der Isolierung von Ribosomen/Polysomen

STRITTMATTER und BALL (1952) berichteten als erste über die Auflösung der Membran von Rattenleber-Mikrosomen durch Desoxycholat und Gewinnung von Ribosomen bzw. Polysomen. LITTLEFIELD et al. (1955) entwickelten die Desoxycholat-Methode, um die "RNP-Partikel" - heute als Ribosomen bzw. Polysomen bezeichnet - der Mikrosomen von den Membranen zu lösen. Desoxycholat und Detergentien mit ähnlichen Eigenschaften werden seitdem allgemein zur Ribosomen-Gewinnung verwendet. Wir haben vergleichende Untersuchungen mit DOC und Triton-X-100 durchgeführt. Die Ribosomen zeigten eine etwa vergleichbare Aktivität. Da es einerseits bekannt ist, daß Desoxycholat den Einbau von Aminosäuren in Protein hemmt (LITTLEFIELD et al. 1955, LITTLEFIELD and KELLER, 1957), andererseits Triton-X-100 sich wesentlich besser als Natriumdesoxycholat aus den Präparationen herauswaschen läßt, verwendeten wir routinemäßig Triton-X-100 zur Isolierung von Ribosomen. In weiteren Versuchen wurde untersucht, ob und wie sich die Einbaukapazität der durch Triton-Behandlung abgelösten Ribosomen nach einmaligem "Waschen" (Resuspendieren in Mg^{++} -Saccharose-Lösung ohne Triton und Abzentrifugieren) verändert.

Wie aus der Tabelle 4 ersichtlich ist, sinkt die Einbaurrate nach "Waschen" erheblich ab, und zwar nach Poly-U-Zugabe um ca. 30 %,

Tabelle 3: Vergleich der Einbauraten von ^{14}C -Phenylalanin in
Proteine von "DOC-Ribosomen" und "Triton-Ribosomen"

"DOC-Ribosomen"	6,2
	6,4
"Triton-Ribosomen"	7,2
	8,2

Die Werte geben an: $\mu\text{Mole } ^{14}\text{C}$ -Phenylalanin eingebaut $\times \text{ mg RNA}^{-1} \times \text{Min.}^{-1}$. Versuchsbedingungen wie im Text bzw. im Abschnitt: Methodik angegeben. Die Ribosomen wurden nicht "gewaschen".

Tabelle 4 Einfluß des "Waschens" von Leber-Ribosomen-Fractionen
auf den Einbau von ^{14}C -Phenylalanin in Proteine

Durch Triton X-100-Behandlung gewonnene Ribosomen (eine Präparation) wurden entweder direkt resuspendiert (in "Standard-Puffer", ohne Triton X-100) und in das Proteinsynthese-System eingesetzt, oder "gewaschen" (d.h. nach dem Resuspendieren 70 Minuten bei 158 000 x g abzentrifugiert).

Versuchsbedingungen wie im Abschnitt "Material und Methoden" angegeben.

Inkubationszeit 60 Minuten.

Angegeben sind die dpm/ μg RNA.

Präparation	Einbauraten		
	Poly-U	nicht "gewaschen"	"gewaschen"
Ribosomen	Ø	250,3	145,9
nach Isolierung mit			
Triton X-100	+	542,5	378,5

ohne Poly-U-Zugabe um ca. 40 %. Wahrscheinlich spielt der Zeitfaktor dabei eine Rolle. Aus diesem Grunde wurde in den folgenden Versuchen auf den Waschvorgang verzichtet.

4. Einfluß des "Hilfssystems" aus Leber- bzw. Gehirn-Hyaloplasma

Der Überstand einer einstündigen - oder auch längeren - Zentrifugation bei mindestens 105 000 x g eines Gewebehomogenates ist definiert als die "lösliche Fraktion", "Zellsaft", "Hyaloplasma" oder auch "Cytogel". Er enthält die Aminosäuren-aktivierenden Enzyme (HOAGLAND et al. 1956), die t-RNA und die Enzyme, die den Transport der Aminoacyl-transfer-RNA an die Ribosomen katalysieren, sowie die löslichen Faktoren der Protein-Synthese.

Von beiden Organen stellten wir jeweils ein Homogenat (Organ: "Standard-Puffer" = 1 : 2 (g/ml) her und zentrifugierten 70 Minuten bei 158 000 x g. Den 158 000 x g Überstand setzten wir in ein Ribosomen-Mikrosomen-System ein. Wie aus der Abbildung 1 ersichtlich ist, hemmt ein Zusatz von Leber-Hyaloplasma den Einbau von ^{14}C -Phenylalanin bereits in relativ geringen Mengen. Wenn man dagegen die zugegebene Menge Gehirn-Hyaloplasma erhöht, tritt dieser Hemmeffekt erst bei höheren Konzentrationen auf. Die absolute Einbaurrate von ^{14}C -Phenylalanin ist dabei höher als bei Leber-Hyaloplasma. Dieser Befund wurde prinzipiell bereits von TIMMLER und NEUBERT vor mehreren Jahren in unserem Institut in bisher nicht publizierten Versuchen erhoben. Er wurde jetzt systematisch untersucht. Wir erhalten einen maximalen Einbau bei einer Zugabe von 0,1 ml Gehirn-Hyaloplasma (welches im Verhältnis Organ: "Standard-Puffer" = 1 : 2 (g/ml) hergestellt wurde). Die Ursache der Hemmung, besonders bei der Zugabe von Leber-Hyaloplasma, ist z.Z. unklar. Die Natur etwa vorhandener Inhibitoren ist unbekannt.

Um eine eindeutige Abhängigkeit der Einbaurrate von der Menge der eingesetzten Ribosomen zu erhalten, ist es jedoch wesentlich, das System mit "Hyaloplasma" und damit mit allen notwendigen Faktoren zu sättigen. Dies ist mit Leber-Hyaloplasma in vielen Fällen nicht möglich.

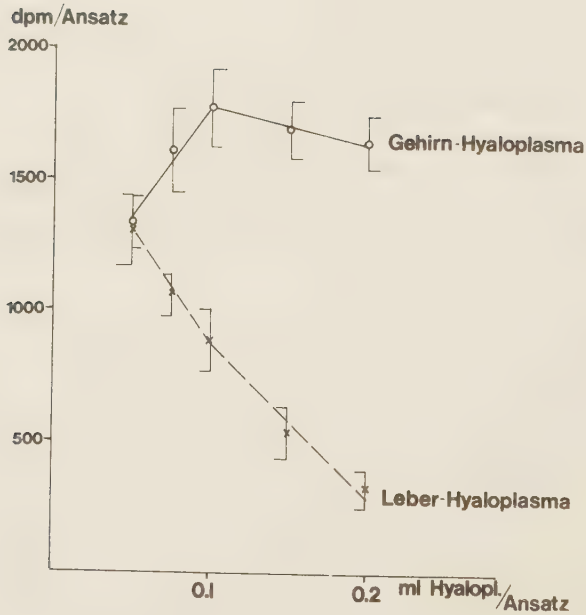


Abbildung 1 Einfluß des "Hilfssystems" aus Leber- bzw. Gehirn-
Hyaloplasma auf den Einbau von ^{14}C -Phenylalanin in
Proteine (Leber-Mikrosomen)

Experimentelle Bedingungen wie in Tabelle 5.

Tabelle 5 Abhängigkeit der ^{14}C -Phenylalanin-Einbauraten von
der zugegebenen Menge Gehirn-Hyaloplasma

ml Gehirn- Hyaloplasma pro Ansatz	% der Einbaurate
0,025	55,1 $\pm$ 4,4
0,05	70,2 $\pm$ 0,4
0,1	100,0 $\pm$ 3,5
0,2	94,8 $\pm$ 1,7

Die Tabelle 5 gibt die Einbauraten von ^{14}C -Phenylalanin - ausgedrückt in Prozenten - mit Leber-Ribosomen wieder, und zwar in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge Gehirn-Hyaloplasma, welches aus einem Homogenat, bestehend aus Gehirn und "Standard-Puffer" im Verhältnis 1 : 2 gewonnen wurde (siehe "Material und Methoden").

Die Einbaurate, die bei der Zugabe von 0,1 ml Gehirn-Hyaloplasma pro 0,5 ml Ansatz resultierte, wurde gleich 100 % gesetzt, eine Zugabe von 0,2 ml des Gehirn-Hyaloplasmas ergaben ca. 95 %, eine Zugabe von 0,05 ml ca. 70 % dieser Einbaurate. Routinemäßig gaben wir später 0,1 ml des Gehirn-Hyaloplasmas zu unseren Ansätzen, was einem RNA-Gehalt von 5 μg RNA bzw. 0,5 mg Protein entsprach.

Selbstverständlich ist das System nur bis zu einer bestimmten Menge von Ribosomen (ca. 100 μg RNA) optimal (siehe auch Abbildung 21).

Wir glauben, daß diese Tatsache in vielen früheren Arbeiten zu wenig berücksichtigt wurde. Besonders eine Aussage unter pathologischen Bedingungen oder bei einer pharmakologischen Fragestellung ist nur verwertbar, wenn klar gezeigt wurde, daß bei dem benutzten System eine lineare Beziehung zwischen Ribosomen-Menge und Einbaurate besteht.

5. Einfluß von SH-Substanzen

HENSHAW et al. (1963) isolierten Rattenleber-Mikrosomen in 0,01 M Tris pH 7,5, 0,01 M $MgCl_2$, 0,06 M KCl, 0,25 M Saccharose und 0,006 M Mercaptoäthanol.

Wir benutzten ebenfalls Mercaptoäthanol und auch "Clelands-Reagenz" (Dithiotreitol) zum Isolieren von Leber-Mikrosomen. Die Endkonzentration von Mercaptoäthanol im sonst unveränderten Präparationsmedium betrug 6 mM, diejenige von Clelands-Reagenz 3 mM oder 6 mM. Das Ergebnis dieser Versuche zeigt die Tabelle 6.

6. Einfluß des Einfrierens in flüssigem Stickstoff auf die Fähigkeit von Mikrosomen bzw. Ribosomen zur Proteinsynthese

Da es eine große Vereinfachung in der Versuchsanordnung bedeutet, wenn an einem Tage Ribosomen/Polysomen und Mikrosomen in größerer Menge isoliert werden und an anderen Tagen die Einbauversuche durchgeführt werden können, versuchten wir, die Einbaukapazität der Ribosomen/Polysomen und Mikrosomen über längere Zeit zu erhalten.

KÖRNER (1961) gibt an, daß Ribosomen bei 0° C gelagert werden können, während KIRSCH et al. (1960) über die Lagerung von Meerschweinchen-Leber-Ribosomen bei -10° C ohne Verlust der Einbaukapazität berichten, wohingegen die Ribosomen einen großen Teil ihrer Aktivität bei einer Lagerung über Nacht bei 0° C verlieren sollen.

Wir froren zuerst die im Standard-Puffer aufgenommenen Ribosomen/Polysomen und Mikrosomen mit einem Kältegemisch aus Äthanol und Trockeneis (CO_2) bei -72° C ein und lagerten sie bei -80° C. Die wieder aufgetauten Fraktionen zeigten sehr unterschiedliche Einbauraten, unabhängig von der Zeit ihrer Lagerung.

Tabelle 6 Einfluß von SH-Substanzen auf den Einbau von ^{14}C -Phenyl-
alanin in Proteine (Mikrosomen)

Versuchsbedingungen wie im Abschnitt "Methodik" angegeben.

Die Zahlen bedeuten: dpm/Ansatz.

Inkubationszeit 7 Minuten.

Substanz	Endkonzentration im Präp. Medium	Einbau von ^{14}C -Phe. in-vitro (dpm/Ansatz)
1. Kontrolle	--	1333,5
2. Mercapto- äthanol	6 mM	889,0
3. Clelands-R.	3 mM	686,0
4. Clelands-R.	6 mM	745,5

Da die Einbauraten nach Zugabe von Mercaptoäthanol oder Clelands-Reagenz zum Präparationsmedium bedeutend unter der Einbaurate des Kontroll-Versuches lagen, verzichteten wir in unseren Versuchen auf die Zugabe von Mercaptoäthanol bzw. Clelands-Reagenz zum Präparationsmedium.

In der Folgezeit froren wir Mikrosomen und Ribosomen/Polysomen als Sediment in flüssigem Stickstoff ein und lagerten sie in Polyäthylentröhrchen in flüssigem Stickstoff.

Wie die Tabelle 7 zeigt, behielten sowohl Ribosomen/Polysomen und Mikrosomen von Lebergewebe als auch von 13 und 14 Tage alten Embryonen über mehrere Wochen ihre volle Einbaukapazität.

Das gleiche gilt für Gehirn-Hyaloplasma (Tabelle 7), welches ebenfalls routinemäßig in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert wurde.

1. Proteinsynthese in embryonalem Rattengewebe (Vergleich mit Leber-Gewebe)

1. Vergleichende Untersuchungen verschiedener Parameter mit Leber- und embryonalem Gewebe. (Aktivität von Mikrosomen sowie Ribosomen/Polysomen ohne und mit Poly-U-Zusatz)

Um optimale Inkubationsbedingungen für die Bestimmung der Proteinsynthese in embryonalem Säugetiergewebe zu finden, untersuchten wir den Einfluß einer Reihe von Parametern auf die in vitro-Proteinsynthese von Mikrosomen und Ribosomen aus embryonalem Gewebe und verglichen die Einbauraten mit Lebergewebe mit und ohne Zusatz von Poly-U. Die Experimente wurden so durchgeführt, daß nur der zu untersuchende Parameter variiert wurde. Aufgrund von Literaturangaben und nach einer großen Anzahl von Vorversuchen wählten wir folgende Standard-Parameter für diese Versuche, die dann entsprechend variiert wurden:

ATP: 0,5 mM; GTP: 1,0 mM; PEP: 5,0 mM; Pyruvatkinase: 10 µg pro 0,5 ml Ansatz; KCl: 74,0 mM; $MgCl_2$: 12,0 mM; pH 7,8

1.1 pH-Abhängigkeit

a) Mikrosomen

Die Abbildung 2 zeigt, daß die Einbaurate ohne Poly-U-Zugabe zwischen pH 6,9 und pH 8,3 relativ konstant ist. Bei Zugabe von Poly-U werden bei pH 8,0 deutlich niedrigere Einbauraten gemessen als bei 7,0 bis 7,5.

Tabelle 7

Einfluß eines Einfrierens in flüssigem Stickstoff und einer Lagerung auf den Einbau von ^{14}C -Phe in Proteine

Rib. = Ribosomen-Fraktion, Ms.= Mikrosomen-Fraktion

Die Werte mit den eingefrorenen Fraktionen wurden vier Wochen nach dem Einfrieren gemessen. Versuchsbedingungen wie in Abschnitt "Methodik" gegeben. Alle Werte stellen Mittelwerte von 4-fach-Bestimmungen dar (Streuung kleiner als 10 %).

Die Werte sind angegeben als $\mu\text{Mole } ^{14}\text{C-Phe eingebaut}$
 $\times \text{mg RNA}^{-1} \times \text{Min.}^{-1}$

	Leber		14-Tage-Embryonen		13-Tage-Embryonen	
	frisch	eingefroren	frisch	eingefroren	frisch	eingefroren
Rib - Poly-U	8,1	7,5	8,2	7,7	7,5	7,6
Rib + Poly-U	35,0	35,8	44,7	42,5	45,4	42,7
Ms - Poly-U	7,7	7,4	10,1	11,2	13,1	14,1
Ms + Poly-U	46,4	45,8	37,9	45,3	32,0	36,1

			Leber		14 Tage Embryonen	
		Poly-U	Rib.	Ms.	Rib.	Ms.
Gehirn- Hyaloplasma	frisch	-	8,2	7,9	7,9	10,9
		+	34,6	45,3	43,6	41,2
	eingefroren	-	7,9	8,0	8,1	10,4
		+	34,8	43,8	43,1	41,8

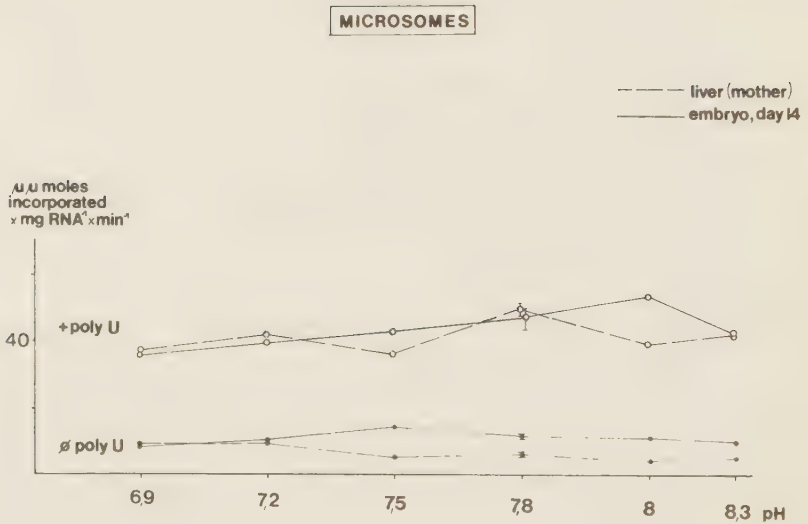


Abbildung 2 Abhängigkeit der ¹⁴C-Phenylalanin-Einbaurrate vom pH-Wert (Mikrosomen)

Mikrosomen von Leber (gestrichelte Linien) und von 14 Tage Embryonen (durchgezogene Linien) mit endogenem "messenger" (gefüllte Symbole) und exogenem "messenger" (offene Symbole).

Inkubationsmedium (außer pH), Inkubationszeit und Herstellung der Mikrosomen, wie im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben.

Als Standardwert wurde ein pH von 7,8 im Ansatz in unseren Versuchen gewählt.

Die Einbauraten sind als $\mu\mu$ mole ¹⁴C-Phenylalanin x mg RNA⁻¹ x Minute⁻¹ angegeben.

b) Ribosomen

Auch hier ist in Gegenwart von Poly-U die Einbaurrate zwischen pH 6,9 und pH 8,3 relativ konstant (Abbildung 3). Unter den Bedingungen, bei denen nur die endogene messenger-RNA abgelesen wird, scheint das pH-Optimum bei pH 7,2 - 7,5 zu liegen.

Diese Untersuchungen zeigen, daß die pH-Optima bei Verwendung verschiedener Matrizen nicht ganz gleich sind. Der Unterschied betrifft jedoch sowohl Lebergewebe als auch embryonales Gewebe.

Eine Zusammenstellung von Literaturangaben über das pH-Optimum der Proteinsynthesen von Rattenleber-Mikrosomen bzw. -Ribosomen gibt Tabelle 8.

1,2 Abhängigkeit von der Magnesium-Konzentration

a) Mikrosomen

Wie aus der Abbildung 4 zu ersehen ist, zeigt sich in Gegenwart von Poly-U eine optimale Einbaurrate, wenn die Mg^{++} -Konzentration 12 mM beträgt. Das Maximum der Einbaurrate unter den Bedingungen des alleinigen Vorhandenseins der endogenen messenger-RNA dagegen liegt bei einer Mg^{++} -Konzentration von 7 - 10 mM.

b) Ribosomen

Die maximalen Einbauraten wurden hier bei den gleichen Mg^{++} -Konzentrationen erzielt wie bei Mikrosomen (Abbildung 5), und zwar mit Poly-U bei einer Magnesium-Konzentration von 12 mM und ohne Poly-U-zugabe bei einer Magnesium-Konzentration von 7 - 10 mM.

Auch bei diesen Versuchen fällt auf, daß sich Lebergewebe und embryonales Gewebe recht gleichartig verhalten.

Bereits ARNSTEIN et al. (1962) beschrieben, daß eine Proteinsynthese mit Poly-U als Matrize eine höhere Mg^{++} -Konzentration benötigt als eine Reaktion mit natürlichem "messenger". Dieser Befund konnte von uns für alle untersuchten Gewebe voll bestätigt werden.

Tabelle 8 pH-Werte, die von verschiedenen Autoren für die Protein-
Synthesen von Ratten-Leber-Mikrosomen bzw. -Ribosomen
angegeben wurden

<u>Autor</u>	<u>pH-Wert</u>
Schmitt, G. et al. (1968)	7,0
Weksler, M.E. and Gelboin, H. (1967)	7,4
Korner, A. (1961)	7,5
Sachs, H. (1957)	7,5
Hultin, T. et al. (1961)	7,5
Bloemendal, H. et al. (1964)	7,6
Hoagland, M.B. et al. (1956)	7,6
Baliga, B.S. et al. (1968)	7,6
Parthier, B. et al. (1967)	7,7
Weinstein, B. et al. (1966)	7,8
Von der Decken, A. (1968)	7,8
Takanami, M. (1960)	7,9

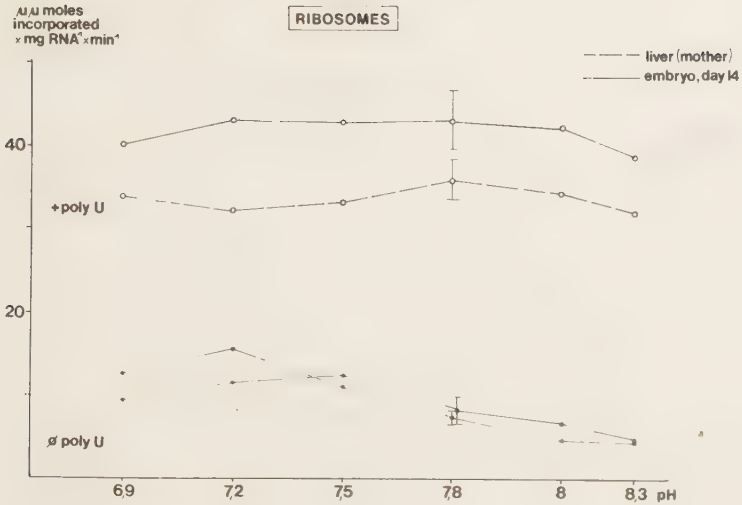


Abbildung 3 Abhängigkeit der ¹⁴C-Phenylalanin-Einbauraten vom pH-Wert (Ribosomen)

Ribosomen von Leber (gestrichelte Linien) und von 14 Tage Embryonen (durchgezogene Linien) mit endogenem "messenger" (gefüllte Symbole) und exogenem "messenger" (offene Symbole).

Inkubationsmedium (außer pH), Inkubationszeit und Herstellung der Ribosomen, wie im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben.

Als Standardwert wurde ein pH von 7,8 im Ansatz in unseren Versuchen gewählt.

Die Einbauraten sind als $\mu\mu \text{ mole } ^{14}\text{C-Phenylalanin} \times \text{mg RNA}^{-1} \times \text{Minute}^{-1}$ angegeben.

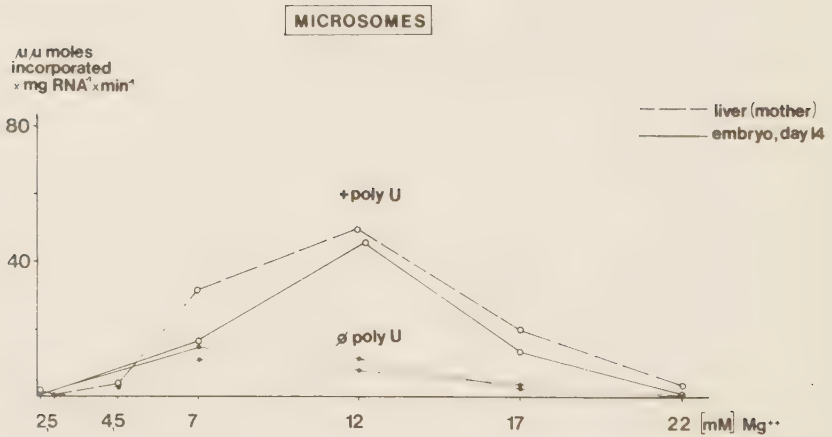


Abbildung 4 Abhängigkeit der ¹⁴C-Phenylalanin-Einbaurrate von der Mg²⁺-Ionen-Konzentration (Mikrosomen)

Mikrosomen von Leber (gestrichelte Linien) und von 14 Tage Embryonen (durchgezogene Linien) mit endogenem "messenger" (gefüllte Symbole) und exogenem "messenger" (offene Symbole).

Inkubationsmedium (außer MgCl₂), Inkubationszeit und Herstellung der Mikrosomen, wie im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben.

Als Standardwert wurde eine MgCl₂-Konzentration von 12 mM im Ansatz in unseren Versuchen gewählt.

Die Einbauraten sind als μμ mole ¹⁴C-Phenylalanin x mg RNA⁻¹ x Minute⁻¹ angegeben.

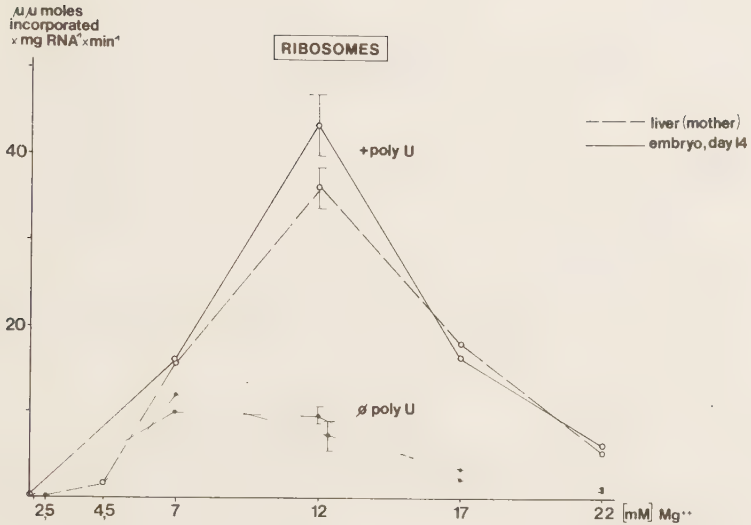


Abbildung 5 Abhängigkeit der ¹⁴C-Phenylalanin-Einbaurate von der Mg²⁺-Ionen-Konzentration (Ribosomen)

Ribosomen von Leber (gestrichelte Linien) und von 14 Tage Embryonen (durchgezogene Linien) mit endogenem "messenger" (gefüllte Symbole) und exogenem "messenger" (offene Symbole).

Inkubationsmedium (außer MgCl₂), Inkubationszeit und Herstellung der Ribosomen, wie im Abschnitte "Material und Methoden" beschrieben.

Als Standardwert wurde eine MgCl₂-Konzentration von 12 mM im Ansatz in unseren Versuchen gewählt.

Die Einbauraten sind als μμ mole ¹⁴C-Phenylalanin x mg RNA⁻¹ x Minute⁻¹ angegeben.

1,3 Abhängigkeit von der ATP-Konzentration

a) Mikrosomen

Einen maximalen Einbau von radioaktivem Phenylalanin findet man in Gegenwart von Poly-U bei einer ATP-Konzentration von 0,5 mM (Abbildung 6). Mit zunehmender ATP-Konzentration wird der Einbau gehemmt. Bei einer ATP-Konzentration von 12,5 mM liegt der Einbau unterhalb der Meßgenauigkeit. Selbst bei Verdoppelung des radioaktiv markierten Phenylalanins liegt die Einbaurrate nach 7 Minuten im Bereich des Leerwertes.

Leber- und Embryo-Mikrosomen, ohne Zugabe von Poly-U, zeigen dagegen einen maximalen Einbau bei einer ATP-Konzentration von ca. 4,0 mM, der bei höheren ATP-Konzentrationen jedoch zunehmend absinkt.

b) Ribosomen

Auch hier wird nach Poly-U Zugabe (Abbildung 7) der maximale Einbau bei einer ATP-Konzentration von 0,5 mM gemessen. Die fast vollständige Hemmung tritt hier ebenfalls bei einer Konzentration über 10,0 auf. Wie bei den Mikrosomen liegt auch bei den Ribosomen ohne Poly-U Zugabe der maximale Einbau bei einer ATP-Konzentration von ca. 4,0 - 5,0 mM. Eine fast vollständige Hemmung des Einbaues beobachten wir, wie bei den Mikrosomen ohne Poly-U Zugabe, bei ca. 10,0 mM.

Die Hemmung des Aminosäure-Einbaues durch hohe Dosen von ATP ist in der Literatur mehrfach beschrieben (z.B. ZAMECNIK and KELLER (1954), SACHS (1957), TAKANAMI (1960), MUNRO et al. (1964). Da die Hemmung durch ATP durch gleichzeitige Gabe von Mg^{++} -Ionen offenbar abgeschwächt werden kann, könnte der Hemmeffekt in einer Komplexbildung des Mg^{++} durch ATP beruhen. Die Hemmung durch ATP würde dann eigentlich einem Mg^{++} -Mangel entsprechen, da Mg^{++} nicht mehr in ausreichender Konzentration für die Reaktionen der Proteinsynthese zur Verfügung steht. Ähnliche Befunde wurden auch von KORNER (1961) erhoben.

1,4 Einfluß eines ATP-regenerierenden-Systems

Phospho-enol-Pyruvat + Pyruvat-Kinase wurden als "ATP-regenerierendes-

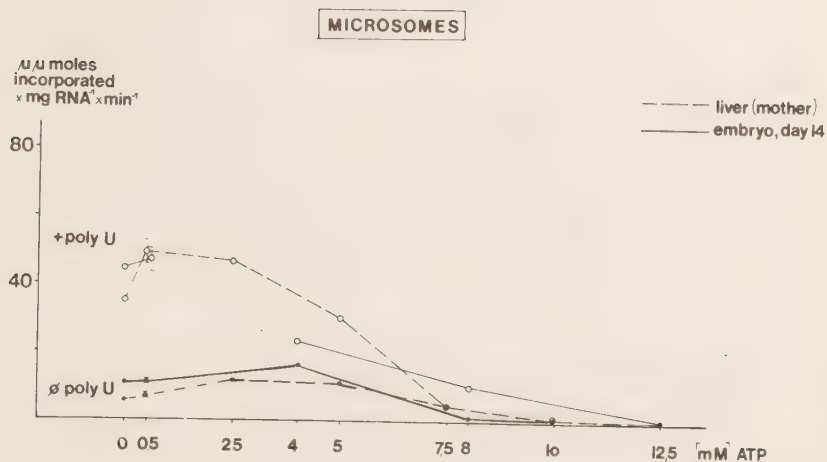


Abbildung 6 Abhängigkeit der ^{14}C -Phenylalanin-Einbaurate von der ATP-Konzentration (Mikrosomen)

Mikrosomen von Leber (gestrichelte Linien) und von 14 Tage Embryonen (durchgezogene Linien) mit endogenem "messenger" (gefüllte Symbole) und exogenem "messenger" (offene Symbole).

Inkubationsmedium (außer ATP), Inkubationszeit und Herstellung der Mikrosomen, wie im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben.

Als Standardwert wurde eine ATP-Konzentration von 0,5 mM im Ansatz in unseren Versuchen gewählt.

Die Einbauraten sind als $\mu\mu \text{ mole } ^{14}\text{C}\text{-Phenylalanin} \times \text{mg RNA}^{-1} \times \text{Minute}^{-1}$ angegeben.

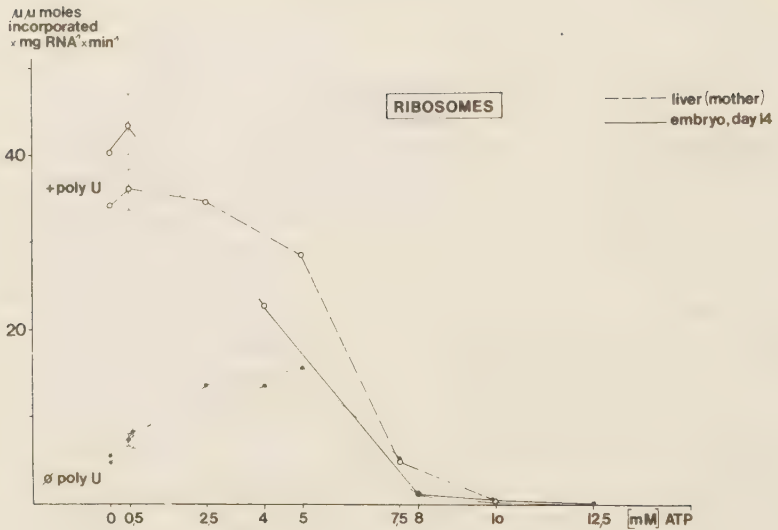


Abbildung 7 Abhängigkeit der ¹⁴C-Phenylalanin-Einbaurrate von der ATP-Konzentration (Ribosomen)

Ribosomen von Leber (gestrichelte Linien) und von 14 Tage Embryonen (durchgezogene Linien) mit endogenem "messenger" (gefüllte Symbole) und exogenem "messenger" (offene Symbole).

Inkubationsmedium (außer ATP), Inkubationszeit und Herstellung der Ribosomen, wie im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben.

Als Standardwert wurde eine ATP-Konzentration von 0,5 mM im Ansatz in unseren Versuchen gewählt.

Die Einbauraten sind als $\mu\text{mole } ^{14}\text{C}\text{-Phenylalanin} \times \text{mg RNA}^{-1} \times \text{Minute}^{-1}$ angegeben.

System" benutzt, um auch bei längeren Inkubationszeiten eine konstante ATP-Konzentration zur Verfügung zu haben. Auf diese Weise wird der Zusatz hoher - hemmender - ATP-Mengen vermieden.

a) Mikrosomen

Das Maximum des Poly-U-stimulierten Aminosäure-Einbaues liegt bei einer PEP-Konzentration von 4 - 8 mM (Abbildung 8), und fällt dann mit steigender PEP-Konzentration langsam ab. Im Gegensatz dazu nimmt die Einbaurrate bei Verwendung eines natürlichen "messengers" mit steigender Konzentration - zumindest bei den Embryo-Mikrosomen - etwas zu, um bei einer Konzentration von 15 mM ihr Maximum zu erreichen.

b) Ribosomen

Die Einbaurrate der Embryo-Ribosomen (Abbildung 9), bei gleichzeitiger Zugabe von Poly-U, zeigt ihr Maximum bei einer PEP-Konzentration von 5 mM. Das Maximum der Einbaurrate der Leber-Ribosomen - bei gleichzeitiger Zugabe von Poly-U - wird bei einer PEP-Konzentration von 2 - 4 mM erreicht. Beide Einbaukurven fallen mit steigender PEP-Konzentration langsam ab und erreichen bei einer Konzentration von 20 mM etwa einen Wert, der der Hälfte der maximalen Einbaurrate entspricht.

Die Einbaukurven der Ribosomen ohne Poly-U Zugabe (endogener "messenger") steigen dagegen bis zu einer Konzentration von 10 - 15 mM an. Mit weiter steigender PEP-Konzentration tritt auch hier eine Hemmung auf.

1,5 Abhängigkeit von der Menge Pyruvat-Kinase im Versuchsansatz

Pyruvat-Kinase ist stabil in einer gesättigten Ammoniumsalzlösung und kommt so in den Handel. Nach Zentrifugieren wurde der Ammoniumsalz-Überstand dekantiert und die Pyruvat-Kinase mit Ionenaustauscher-Wasser aufgenommen. Wie die Abbildung 10 und Abbildung 11 zeigen, sind die Einbauraten sowohl mit als auch ohne Poly-U Zugabe über einen Bereich von 0 - 100 µg Kinase pro 1 ml Inkubationsansatz ziemlich gleichbleibend. Gehirn-Hyaloplasma enthält offenbar bereits eine ausreichende Menge des Enzyms.

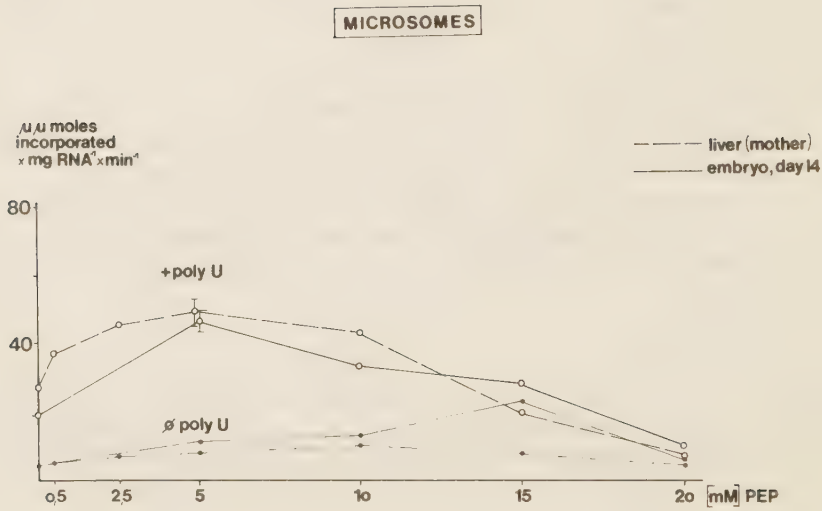


Abbildung 8

Abhängigkeit der ¹⁴C-Phenylalanin-Einbaurate von der PEP-Konzentration (Mikrosomen)

Mikrosomen von Leber (gestrichelte Linien) und von 14 Tage Embryonen (durchgezogene Linien) mit endogenem "messenger" (gefüllte Symbole) und exogenem "messenger" (offene Symbole).

Inkubationsmedium (außer PEP), Inkubationszeit und Herstellung der Mikrosomen, wie im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben.

Als Standardwert wurde eine PEP-Konzentration von 5 mM im Ansatz in unseren Versuchen gewählt.

Die Einbauraten sind als $\mu\mu$ mole ¹⁴C-Phenylalanin x mg RNA⁻¹ x Minute⁻¹ angegeben.

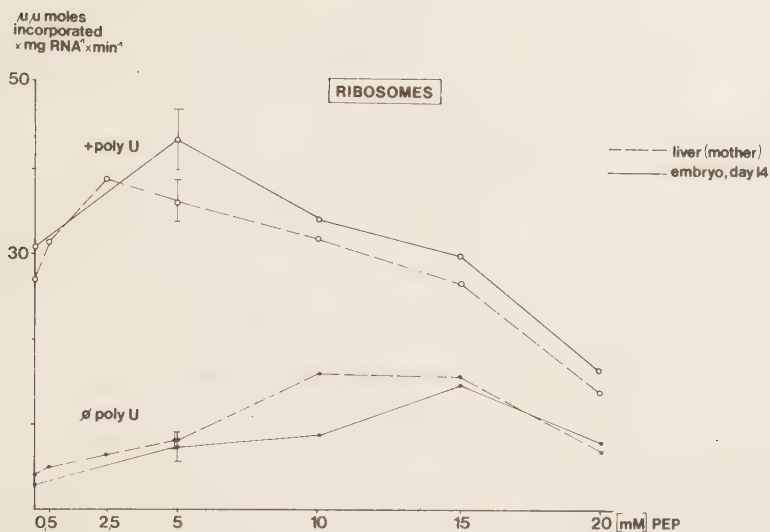


Abbildung 9 Abhängigkeit der ^{14}C -Phenylalanin-Einbauraten von der PEP-Konzentration (Ribosomen)

Ribosomen von Leber (gestrichelte Linien) und von 14 Tage Embryonen (durchgezogene Linien) mit endogenem "messenger" (gefüllte Symbole) und exogenem "messenger" (offene Symbole).

Inkubationsmedium (außer PEP), Inkubationszeit und Herstellung der Ribosomen, wie im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben.

Als Standardwert wurde eine PEP-Konzentration von 5 mM im Ansatz in unseren Versuchen gewählt.

Die Einbauraten sind als $\mu\mu \text{ mole } ^{14}\text{C}\text{-Phenylalanin} \times \text{mg RNA}^{-1} \times \text{Minute}^{-1}$ angegeben.

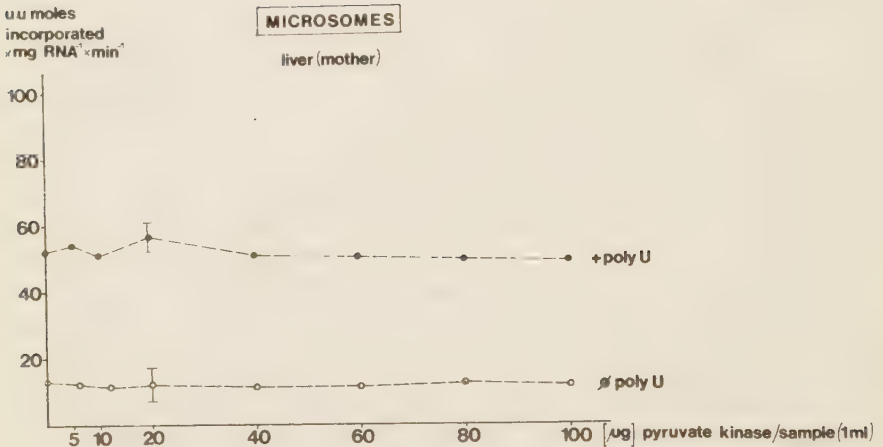


Abbildung 10 Abhängigkeit der ¹⁴C-Phenylalanin-Einbaurrate von der Pyruvat-Kinase-Konzentration (Mikrosomen)

Mikrosomen von Leber mit endogenem "messenger" (offene Symbole) und exogenem "messenger" (gefüllte Symbole). Inkubationsmedium (außer Pyruvat-Kinase), Inkubationszeit und Herstellung der Mikrosomen, wie im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben.

Als Standardwert wurde eine Pyruvat-Kinase-Konzentration von 20 µg pro ml Ansatz in unseren Versuchen gewählt.

Die Einbauraten sind als µu mole ¹⁴C-Phenylalanin x mg RNA⁻¹ x Minute⁻¹ angegeben.

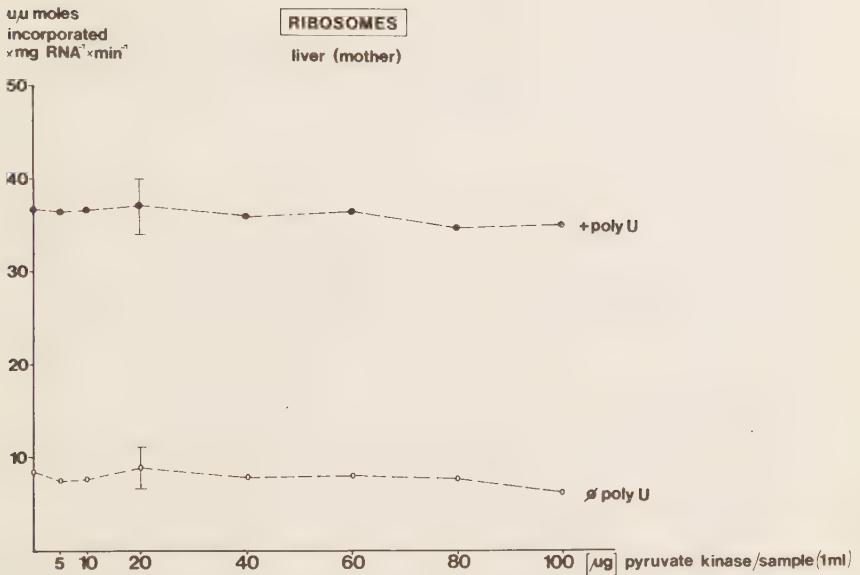


Abbildung 11 Abhängigkeit der ¹⁴C-Phenylalanin-Einbaurate von der Pyruvat-Kinase-Konzentration (Ribosomen)

Ribosomen von Leber mit endogenem "messenger" (offene Symbole) und exogenem "messenger" (gefüllte Symbole). Inkubationsmedium (außer Pyruvat-Kinase), Inkubationszeit und Herstellung der Mikrosomen, wie im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben.

Als Standardwert wurde eine Pyruvat-Kinase-Konzentration von 20 μg pro ml Ansatz in unseren Versuchen gewählt. Die Einbauraten sind als μμ mole ¹⁴C-Phenylalanin x mg RNA⁻¹ x Minute⁻¹ angegeben.

1,6 Abhängigkeit von der GTP-Konzentration

Die Einbauraten sowohl der Mikrosomen als auch der Ribosomen, bei gleichzeitiger Zugabe von Poly-U, ähneln sehr den entsprechenden Kurven, wie sie mit ATP gewonnen wurden.

a) Mikrosomen

Das Maximum der Kurven (Abbildung 12) liegt bei einer GTP-Konzentration von 1 mM. Mit steigender Konzentration nimmt die Einbaurrate, besonders bei den Versuchen mit Poly-U Zugabe, immer mehr ab. Bei den Versuchen ohne Poly-U Zugabe ist die Einbaurrate über einen gewissen Bereich hin (0,5 - 5,0 mM) relativ konstant.

b) Ribosomen

Auch hier haben wir bei den Versuchen ohne Poly-U Zugabe (Abbildung 13) über einen Bereich von 0,5 - 1,0 mM einen relativ konstanten Einbau. Bei den Ansätzen mit Poly-U Zugabe finden wir wiederum, wie bei den Mikrosomen, eine maximale Einbaurrate bei einer GTP-Konzentration von etwa 1 mM. Mit steigender GTP-Konzentration fällt die Einbaurrate ab.

Die Hemmung durch hohe Konzentrationen von GTP wird wahrscheinlich - ähnlich wie beim ATP besprochen - durch Komplexbildung mit Mg^{++} verursacht. Eine vergleichsweise hohe Menge von GTP wird im Ansatz benötigt, da GTP -ähnlich wie ATP- durch ...asen gespalten werden kann.

1,7 Abhängigkeit von der KCl-Konzentration

a) Mikrosomen

Die Einbaurrate zeigt hier mit Leber-Mikrosomen ein Maximum bei einer Kaliumchlorid-Konzentration von 96 mM, und zwar sowohl mit als auch ohne Zugabe von Poly-U, während die maximale Einbaurrate der Embryo-Mikrosomen wohl etwas niedriger liegt, nämlich bei einer Kaliumchlorid-Konzentration von etwa 70 mM, sowohl mit als auch ohne Zugabe von Poly-U.

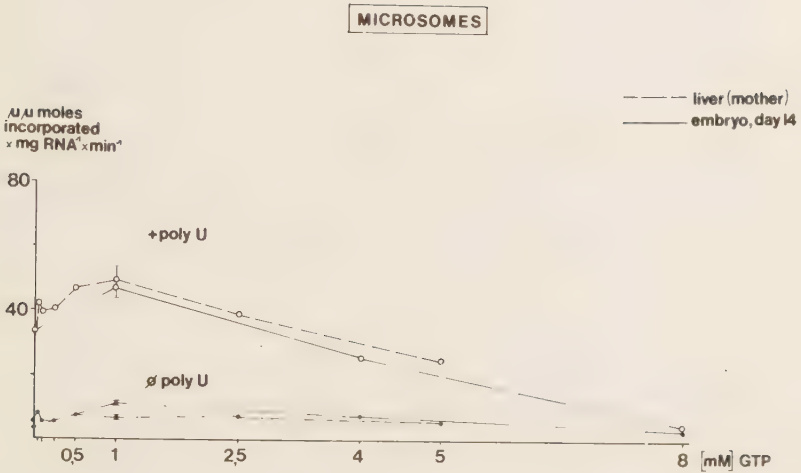


Abbildung 12 Abhängigkeit der ¹⁴C-Phenylalanin-Einbaurrate von der GTP-Konzentration (Mikrosomen)

Mikrosomen von Leber (gestrichelte Linien) und von 14 Tage Embryonen (durchgezogene Linien) mit endogenem "messenger" (gefüllte Symbole) und exogenem "messenger" (offene Symbole).

Inkubationsmedium (außer GTP), Inkubationszeit und Herstellung der Mikrosomen, wie im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben.

Als Standardwert wurde eine GTP-Konzentration von 1 mM im Ansatz in unseren Versuchen gewählt.

Die Einbauraten sind als $\mu\mu$ mole ¹⁴C-Phenylalanin $\times$ mg RNA⁻¹ $\times$ Minute⁻¹ angegeben.

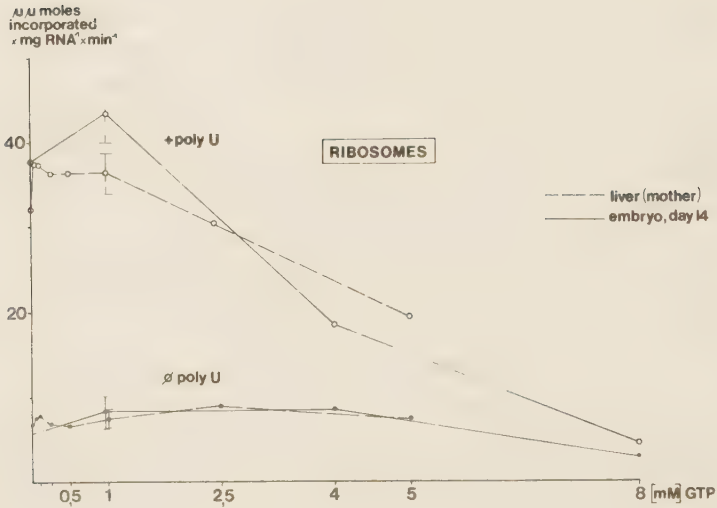


Abbildung 13 Abhängigkeit der ^{14}C -Phenylalanin-Einbaurrate von der GTP-Konzentration (Ribosomen)

Ribosomen von Leber (gestrichelte Linien) und von 14 Tage Embryonen (durchgezogene Linien) mit endogenem "messenger" (gefüllte Symbole) und exogenem "messenger" (offene Symbole).

Inkubationsmedium (außer GTP), Inkubationszeit und Herstellung der Ribosomen, wie im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben.

Als Standardwert wurde eine GTP-Konzentration von 1 mM im Ansatz in unseren Versuchen gewählt.

Die Einbauraten sind als $\mu\mu \text{ mole } ^{14}\text{C}\text{-Phenylalanin} \times \text{mg RNA}^{-1} \times \text{Minute}^{-1}$ angegeben.

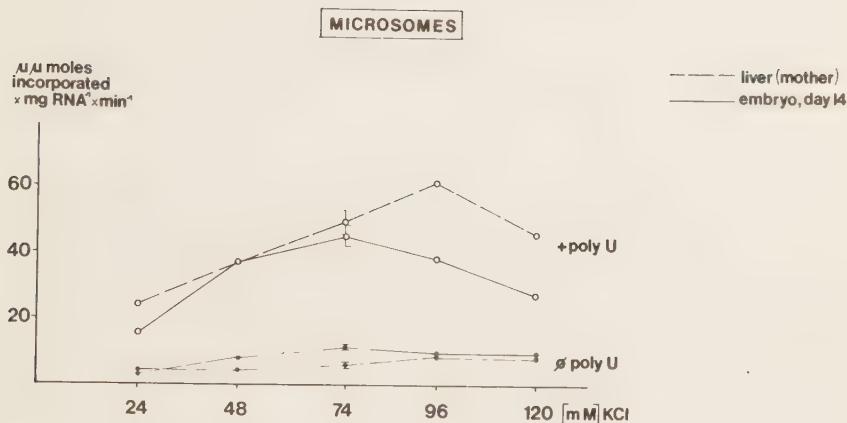


Abbildung 14 Abhängigkeit der ^{14}C -Phenylalanin-Einbaurrate von der K^+ -Ionen-Konzentration (Mikrosomen)

Mikrosomen von Leber (gestrichelte Linien) und von 14 Tage Embryonen (durchgezogene Linien) mit endogenem "messenger" (gefüllte Symbole) und exogenem "messenger" (offene Symbole).

Inkubationsmedium (außer KCl), Inkubationszeit und Herstellung der Mikrosomen, wie im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben.

Als Standardwert wurde eine KCl-Konzentration von 74 mM im Ansatz in unseren Versuchen gewählt.

Die Einbauraten sind als $\mu\mu \text{ mole } ^{14}\text{C}\text{-Phenylalanin} \times \text{mg RNA}^{-1} \times \text{Minute}^{-1}$ angegeben.

b) Ribosomen

Bei Ribosomen erhalten wir den optimalen Einbau von radioaktivem Phenylalanin bei einer Kaliumchlorid-Konzentration von 60 - 80 mM. Anzuführen ist hier noch, daß die Embryo-Ribosomen etwas höhere Einbauraten erreichen als die Leber-Ribosomen bei der gleichen Kaliumchlorid-Konzentration.

Über die Frage, ob Na^+ - oder K^+ -Ionen spezifisch für den Vorgang der Proteinsynthese benötigt werden, herrscht in der Literatur offenbar noch keine Einigkeit (WUST and NOVELLI 1964; SACHS 1957; KORNER 1961). Auch von der Pyruvat-Kinase, die als Hilfssystem benötigt wird, ist bekannt, daß sie eine optimale Aktivität in Gegenwart von K^+ -Ionen aufweist (BOYER et al. 1942).

1,8 Abhängigkeit von der NH_4Cl -Konzentration

Um festzustellen, inwieweit sich KCl durch einen anderen Elektrolyten gleicher Ionenstärke ersetzen läßt, prüften wir die Abhängigkeit der Einbauraten von der NH_4Cl -Konzentration. Dabei wurde KCl nicht vollständig durch NH_4Cl ersetzt, da durch den Standard-Puffer, der ebenfalls K^+ -Ionen enthält, die K^+ -Ionen-Konzentration im Ansatz bereits 24 mM beträgt. Um die Einbauraten dieses Versuchs mit denen vergleichen zu können, die wir bei der Prüfung der Abhängigkeit der Einbauraten von der KCl-Konzentration erhielten, wählten wir für die einzelnen Meßpunkte die gleichen Konzentrationen wie dort, indem wir die KCl-Konzentration von 24 mM mit der jeweils notwendigen NH_4Cl -Konzentration zur gewünschten Konzentration ergänzten.

Die aus diesem Versuch resultierenden Kurven der Einbauraten ähneln in ihrem Verlauf sehr denjenigen, die wir bei der Prüfung der Abhängigkeit der Einbauraten von der KCl-Konzentration erhielten (siehe Abbildungen 14 und 15). Sie zeigten im allgemeinen etwas höhere Einbauraten. Das heißt also, daß KCl sich gut in diesem System durch NH_4Cl ersetzen läßt. Wie oben bereits erwähnt, muß man allerdings dabei berücksichtigen, daß in unserem Versuch KCl nicht vollständig, sondern nur der Betrag durch NH_4Cl ersetzt wurde, der die KCl-Konzentration von 24 mM überstieg.

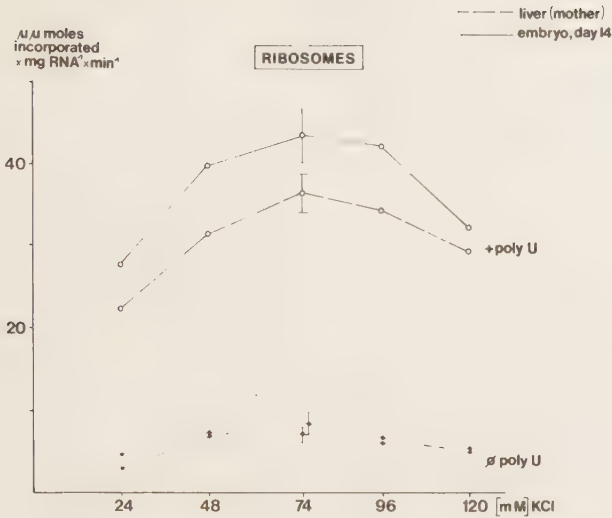


Abbildung 15 Abhängigkeit der ^{14}C -Phenylalanin-Einbaurrate von der K^+ -Ionen-Konzentration (Ribosomen)

Ribosomen von Leber (gestrichelte Linien) und von 14 Tage Embryonen (durchgezogene Linien) mit endogenem "messenger" (gefüllte Symbole) und exogenem "messenger" (offene Symbole).

Inkubationsmedium (außer KCl), Inkubationszeit und Herstellung der Ribosomen, wie im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben.

Als Standardwert wurde eine KCl-Konzentration von 74 mM im Ansatz in unseren Versuchen gewählt.

Die Einbauraten sind als $\mu\mu \text{ mole } ^{14}\text{C}\text{-Phenylalanin} \times \text{mg RNA}^{-1} \times \text{Minute}^{-1}$ angegeben.

$\mu\mu$ moles
incorporated
 $\times \text{mg RNA}^{-1} \times \text{min}^{-1}$

MICROSOMES

liver (mother)

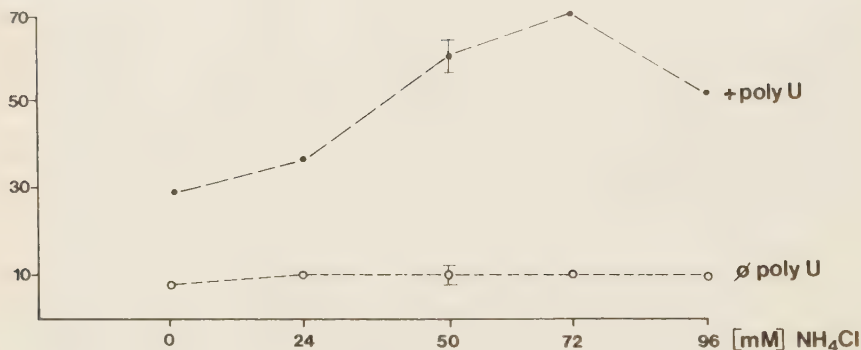


Abbildung 16 Abhängigkeit der ^{14}C -Phenylalanin-Einbaurrate vom teilweisen Ersatz der K^+ -Ionen durch NH_4^+ -Ionen (Mikrosomen)

Mikrosomen von Leber mit endogenem "messenger" (offene Symbole) und exogenem "messenger" (gefüllte Symbole). Routine-Inkubationsansatz (siehe "Material und Methoden"). Die K^+ -Ionen-Konzentration war in allen Versuchsansätzen 24 mM.

Die Einbauraten sind als $\mu\mu$ mole ^{14}C -Phenylalanin $\times \text{mg RNA}^{-1} \times \text{Minute}^{-1}$ angegeben.

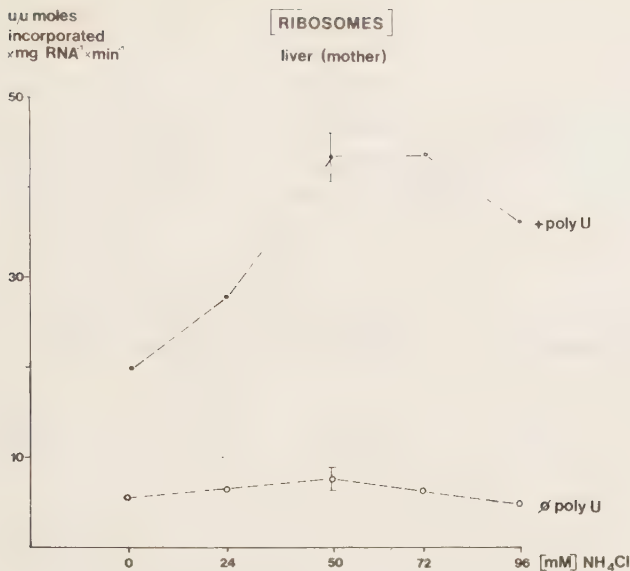


Abbildung 17 Abhängigkeit der ^{14}C -Phenylalanin-Einbauraten vom teilweisen Ersatz der K^+ -Ionen durch NH_4^+ -Ionen (Ribosomen)

Ribosomen von Leber mit endogenem "messenger" (offene Symbole) und exogenem "messenger" (gefüllte Symbole). Routine-Inkubationsansatz (siehe "Material und Methoden"). Die K^+ -Ionen-Konzentration war in allen Versuchsansätzen 24 mM.

Die Einbauraten sind als $\mu\text{u mole } ^{14}\text{C}\text{-Phenylalanin} \times \text{mg RNA}^{-1} \times \text{Minute}^{-1}$ angegeben.

Aus den Abbildungen 2 bis 17 lassen sich folgende Gemeinsamkeiten entnehmen:

- 1) Die Einbauraten sind je nachdem, ob Poly-U zugegeben wurde oder ob nur die endogene messenger-RNA vorhanden ist, sehr verschieden, und zwar steigen die Werte nach Poly-U Zugabe auf das 4 - 6fache.
- 2) Mikrosomen und Ribosomen/Polysomen aus Lebergewebe einerseits und Mikrosomen und Ribosomen/Polysomen aus Embryonen andererseits verhalten sich in bezug auf die getesteten Parameter sehr ähnlich.

1,9 Zeitabhängigkeit der Proteinsynthese mit Mikrosomen und Ribosomen von Leber und 14 Tage Embryonen

Um in unserem System etwas über die Einbauraten von Mikrosomen und Ribosomen in Abhängigkeit von der Zeit aussagen zu können, untersuchten wir die Einbauraten von Mikrosomen und Ribosomen sowohl von Leber als auch von 14 Tage alten Embryonen nach verschiedenen Inkubationszeiten.

Während die Einbaukurven der Mikrosomen spätestens nach 120 Minuten ihr Maximum erreicht haben und nach etwa 20 Minuten nur noch sehr schwach ansteigen, steigen die Einbaukurven der Ribosomen auch nach 20 Minuten Inkubationszeit noch an, und sie haben auch nach 180 Minuten ihr Maximum noch nicht erreicht.

Einen linearen Anstieg können wir bei den Mikrosomen bis zu etwa 10 Minuten Inkubationszeit messen, bei den Ribosomen bis zu etwa 20 Minuten Inkubationszeit. Wir wählten für unsere Versuche mit Mikrosomen daher eine Inkubationszeit von 7 Minuten, bei Einbauversuchen mit Ribosomen dagegen eine Inkubationszeit von 20 Minuten.

Für den Verlauf der Zeitkurven scheint es von untergeordneter Bedeutung zu sein, aus welchem Gewebe (14 Tage Embryonen oder Leber) die Mikrosomen und Ribosomen gewonnen werden, denn die Zeitkurven der Leber-Mikrosomen ähneln sehr denen der 14 Tage Embryonen-Mikrosomen und die der Leber-Ribosomen denen der 14 Tage Embryonen-Ribosomen in ihrem Verlauf.

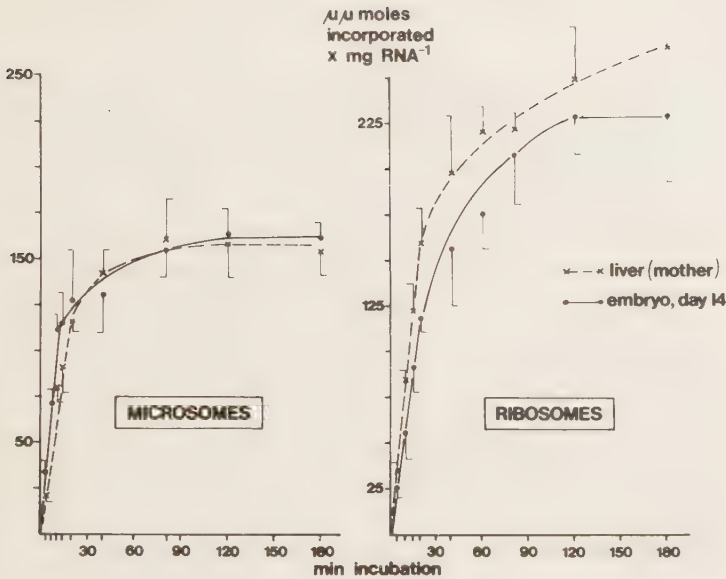


Abbildung 18

Zeitabhängigkeit der Protein-
synthese mit Mikrosomen von Leber
und 14 Tage Embryonen

Leber-Mikrosomen (gestrichelte Linie) und 14 Tage Embryonen-Mikrosomen (durchgezogene Linie). Gewinnung der Mikrosomen und Inkubationsansatz wie unter "Material und Methoden" beschrieben. Die Einbausraten sind als $\mu\mu$ mole $\times$ mg RNA⁻¹ angegeben.

Abbildung 19

Zeitabhängigkeit der Protein-
synthese mit Ribosomen von Leber
und 14 Tage Embryonen

Leber-Ribosomen (gestrichelte Linie) und 14 Tage Embryonen-Ribosomen (durchgezogene Linie). Gewinnung der Ribosomen und Inkubationsansatz wie unter "Material und Methoden" beschrieben. Die Einbausraten sind als $\mu\mu$ mole $\times$ mg RNA⁻¹ angegeben.

1,10 Fermentabhängigkeit der Proteinsynthese in Mikrosomen und Ribosomen von Leber und 14 Tage Embryonen

Um zu erfahren, welches die günstigsten Mengen an Ribosomen bzw. Mikrosomen für die Einbau-Versuche mit unserem 0,5 ml System sind, testeten wir die Abhängigkeit der ^{14}C -Phenylalanin-Einbauraten von der zugesetzten Menge Mikrosomen bzw. Ribosomen bezogen auf RNA. Bis zu einer zugesetzten Fermentmenge von ca. 100 μg RNA/0,5 ml Ansatz zeigte sich eine lineare Beziehung zur ^{14}C -Phenylalanin-Einbaurate, und zwar sowohl mit Leber-Mikrosomen und -Ribosomen als auch mit 14 Tage Embryonen-Mikrosomen und -Ribosomen.

Routinemäßig setzten wir bei jedem Versuch jeweils 0,05 ml und 0,1 ml Mikrosomen bzw. Ribosomen ein, um in jedem Falle sicher zu gehen, daß wir uns im linearen Bereich befanden. Die von uns eingesetzten Mikrosomen- und Ribosomen-Suspensionen hatten in der Regel einen RNA-Gehalt von 850 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

2.) Versuche mit embryonalem Gewebe in verschiedenen Stadien der Entwicklung

Um zu erfahren, ob während der Periode der Organogenese, die sich bei Ratten-Embryonen über die Tage 8 bis 13 nach der Befruchtung erstreckt, Unterschiede in der Aminosäure-Einbaurate auftreten, untersuchten wir den ^{14}C -Phenylalanin-Einbau von Mikrosomen und Ribosomen/Polysomen von 11, 12, 13 und 14 Tage alten Embryonen und verglichen sie mit denen von Leber-Mikrosomen und -Ribosomen/Polysomen. Vor Tag 11 lassen sich wegen der geringen vorhandenen Gewebemengen einerseits und der benötigten Menge an Mikrosomen und Ribosomen/Polysomen andererseits solche Versuche bis jetzt nicht durchführen. Gleichzeitig wurde in allen Versuchsserien die Stimulierbarkeit durch Poly-U geprüft. Der Einbau von ^{14}C -Phenylalanin wurde auf RNA bezogen. Diese Versuche sagen somit etwas über die Kapazität der Mikrosomen und Ribosomen für die Proteinsynthese aus. Durch Poly-U konnte regelmäßig eine Stimulierung des Einbaus beobachtet werden.

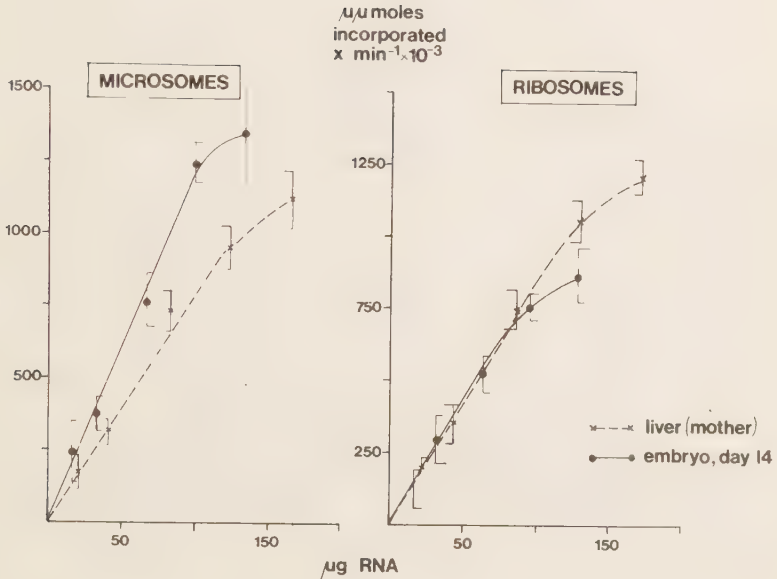


Abbildung 20

Fermentabhängigkeit der Protein-
synthese in Mikrosomen von Leber
und 14 Tage Embryonen

Leber-Mikrosomen (gestrichelte Linie) und 14 Tage Embryonen-Mikrosomen (durchgezogene Linie). Gewinnung der Mikrosomen und Inkubationsansatz wie unter "Material und Methoden" beschrieben. Die Einbauraten sind als $\mu\mu\text{ mole } \times \text{ Minute}^{-1} \times 10^{-3}$ angegeben.

Abbildung 21

Fermentabhängigkeit der Protein-
synthese in Ribosomen von Leber
und 14 Tage Embryonen

Leber-Ribosomen (gestrichelte Linie) und 14 Tage Embryonen-Ribosomen (durchgezogene Linie). Gewinnung der Ribosomen und Inkubationsansatz wie unter "Material und Methoden" beschrieben. Die Einbauraten sind als $\mu\mu\text{ mole } \times \text{ Minute}^{-1} \times 10^{-3}$ angegeben.

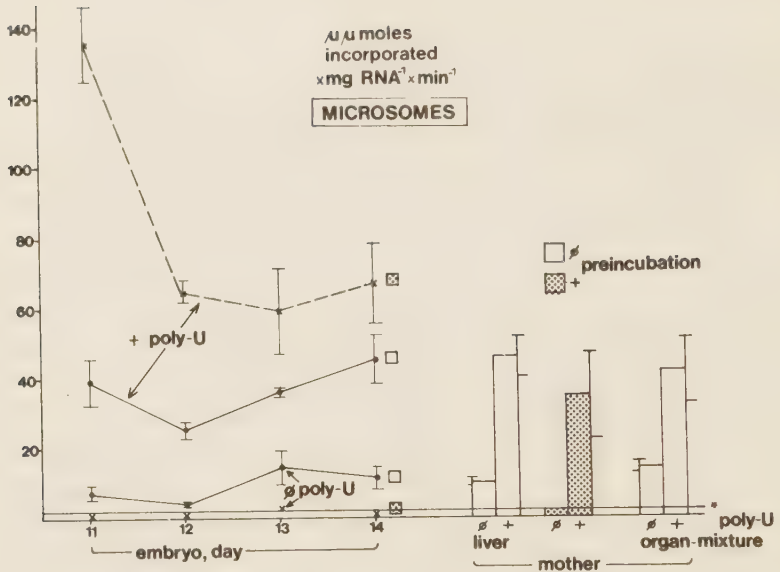


Abbildung 22 Versuche mit embryonalem Gewebe in verschiedenen Stadien der Entwicklung (Mikrosomen)

Die Abbildung zeigt die ^{14}C -Phenylalanin-Einbauraten mit Mikrosomen von 11, 12, 13 und 14 Tage alten Embryonen, von Leber und von einem Organ-gemisch mit Poly-U (+ poly-U) und ohne Poly-U (Ø poly-U) sowohl mit vorinkubierten Mikrosomen (Kreuze und gestrichelte Linien bzw. ausgefüllte Säulen) als auch mit nicht-vorinkubierten Mikrosomen (Punkte und durchgezogene Linien bzw. leere Säulen).

Die Mikrosomen des Organgemisches (Leber, Herz, Thymus, Lunge, Niere, Pankreas, Gehirn, Milz) von erwachsenen Ratten sind nicht vorinkubiert worden. Inkubationsansatz und Gewinnung der Mikrosomen wie im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben.

Dauer der Vorinkubation: 20 Minuten
Die Einbauraten sind als $\mu\mu$ mole ^{14}C -Phenylalanin $\times \text{mg RNA}^{-1} \times \text{Minute}^{-1}$ angegeben.

* 0,3 = untere Meßbereichsgrenze

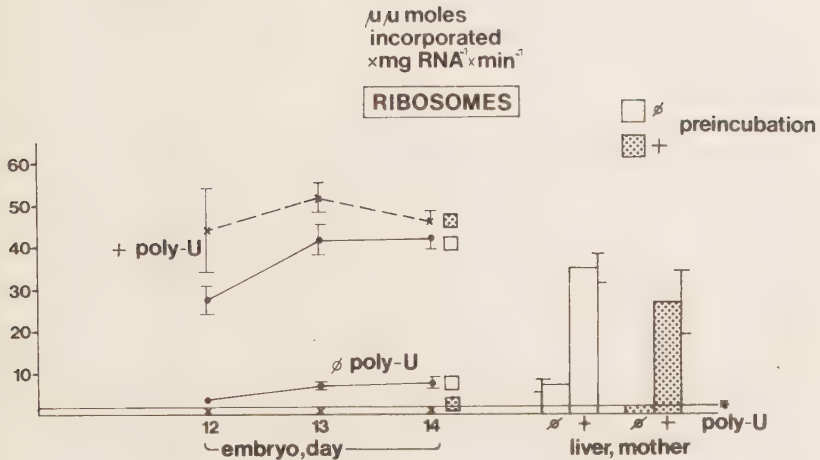


Abbildung 23 Versuche mit embryonalem Gewebe in verschiedenen Stadien der Entwicklung (Ribosomen)

Die Abbildung zeigt die ^{14}C -Phenylalanin-Einbauraten von 12, 13 und 14 Tage alten Embryonen und von Leber mit Poly-U (+ poly-U) und ohne Poly-U (∅ poly-U) sowohl mit vorinkubierten Ribosomen (Kreuze und gestrichelte Linien bzw. ausgefüllte Säulen) als auch mit nicht-vorinkubierten Ribosomen (Punkte und durchgezogene Linien bzw. leere Säulen).

Inkubationsansatz und Gewinnung der Ribosomen wie im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben.

Dauer der Vorinkubation: 120 Minuten

Die Einbauraten sind als $\mu\mu$ mole ^{14}C -Phenylalanin $\times \text{mg RNA}^{-1} \times \text{Minute}^{-1}$ angegeben.

* 0,3 = untere Meßbereichsgrenze

Wir hatten eine Verringerung der Proteinsynthese-Rate mit ansteigendem Alter der Embryonen erwartet, da die Wachstumsrate des embryonalen Gewebes während dieser Periode bereits deutlich langsamer wird. Doch es sieht so aus, als ob die Proteinsynthesekapazität der einzelnen Ribosomen und Mikrosomen zwischen den Tagen 12 und 14 bzw. 11 und 14 ansteigt, und zwar sowohl mit als auch ohne Poly-U.

Mikrosomen und Ribosomen von erwachsener Leber einerseits und von Embryonen andererseits zeigen einen Einbau in der gleichen Größenordnung.

Da Leber von erwachsenen Tieren möglicherweise ein ungeeignetes Vergleichsorgan darstellt, weil Lebergewebe ungewöhnlich hohe Syntheseleistungen aufweist, untersuchten wir die ^{14}C -Phenylalanin-Einbauraten von Mikrosomen, die wir aus einer Mixtur von 8 verschiedenen Organen erwachsener Ratten nach unserem Routine-Verfahren (s. Methodik) gewonnen hatten. Diese Organe waren Leber, Herz, Thymus, Lunge, Niere, Pankreas, Gehirn und Milz. Die Einbaurate dieser Mikrosomen liegt in der gleichen Größenordnung wie die der Embryonen-Mikrosomen.

3.) Versuche mit Homogenaten

Die Versuche, die wir mit Mikrosomen und Ribosomen von Embryonen in verschiedenen Stadien der Entwicklung und von Organen erwachsener Tiere durchführten, machten Aussagen über die Proteinsynthesekapazität der Mikrosomen und Ribosomen, da der Einbau von ^{14}C -Phenylalanin auf RNA bezogen wurde.

Um nun zu erfahren, wie groß wohl die Proteinsynthesekapazität der gesamten Zelle von Embryonen der Tage 11 bis 14 im Vergleich zu der von Zellen erwachsenen Gewebes ist, setzten wir Homogenate der zu untersuchenden Gewebe anstelle von Mikrosomen und Ribosomen/Polysomen in unser in-vitro-System ein. Wir wählten diesmal DNA als Bezugssystem für die ^{14}C -Phenylalanin-Einbauraten (Abbildung 24).

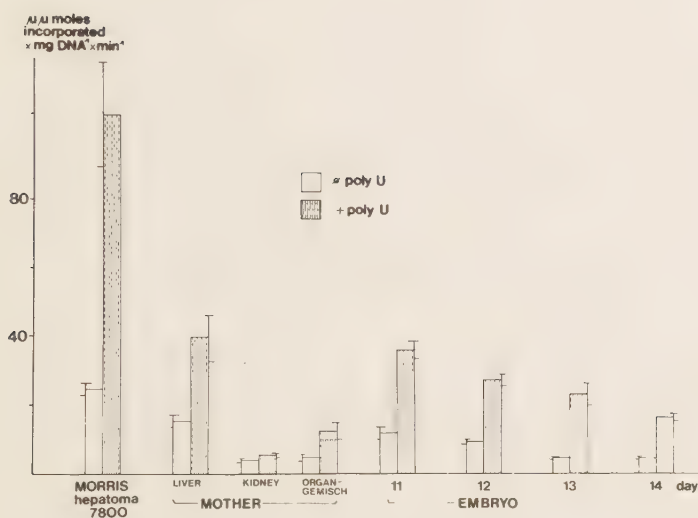


Abbildung 24 Einbau von ^{14}C -Phenylalanin in Protein mit Homogenaten verschiedener Gewebe

Die Abbildung zeigt einen Vergleich der ^{14}C -Phenylalanin-Einbausraten mit Homogenaten verschiedener Gewebe, und zwar sowohl mit (ausgefüllte Säulen) als auch ohne (leere Säulen) Poly-U. Es wurden Homogenate von 11, 12, 13 und 14 Tage Embryonen, von Leber, Niere einem Organgemisch (Leber, Herz, Thymus, Lunge, Niere, Pankreas, Gehirn, Milz) der Muttertiere und von Morris-Hepatoma 7800 bereitet.

Inkubationsansatz und Herstellung der Homogenate wie im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben.

Inkubationszeit 15 Minuten.

Die Einbausraten sind als $\mu\text{Mole} \times \text{mg DNA}^{-1} \times \text{Minute}^{-1}$ angegeben.

Für diese Versuche stellten wir jeweils Homogenate von 11 bis 14 Tage alten Embryonen denen von langsam wachsendem Morris-Hepatom 7800, von Leber, von Niere und von einem Gemisch aus 8 verschiedenen Organen (Leber, Herz, Thymus, Lunge, Niere, Pankreas, Gehirn, Milz) gegenüber. Hier zeigte sich nun ein Abfall der Einbauraten zwischen dem Tag 11 und 14 der Embryonen, und zwar sowohl mit als auch ohne Poly-U Zugabe. Während die Einbauraten der 11 Tage Embryonen in der gleichen Größenordnung liegen wie die der Leber, entsprechen die der 14 Tage Embryonen etwa denen des Organgemisches.

Das Morris-Hepatom, welches eine viel geringere Wachstumsrate als embryonales Gewebe besitzt, zeigt in diesem Versuch die weitaus größten Einbauraten.

Der hohe Nettozuwachs an Proteinen, der während der embryonalen Entwicklung in der schnellen Wachstumsphase zweifellos auftritt, könnte durch eine besonders hohe Halbwertszeit embryonaler Gewebe begünstigt werden.

Der Einbau von ^{14}C -Phenylalanin wird jedenfalls nicht in dem Maße erhöht gefunden, wie es dem außergewöhnlichen Wachstum entsprechen würde.

III. Versuche zur Isolierung von Polysomen-Fraktionen im linearen Saccharose-Gradienten

Um die Ribosomen noch weiter aufzuschlüsseln, fraktionierten wir sie mit einem kontinuierlichen Saccharose-Gradienten. Nach dem Zentrifugieren wurden die Röhrchen punktiert und Fraktionen zu je 20 Tropfen gesammelt. Ein Aliquot jeder Fraktion wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm im Spektrophometer Typ DB Beckman gemessen. Die aufgetragenen, miteinander verbundenen Meßwerte ergaben das abgebildete Sedimentationsprofil (Abbildung 25 für Mono-, Di- und Polysomen.

Um einigermaßen reproduzierbare Sedimentationsprofile zu erhalten, mußten wir Vorversuche durchführen, um die geeigneten Saccharose-

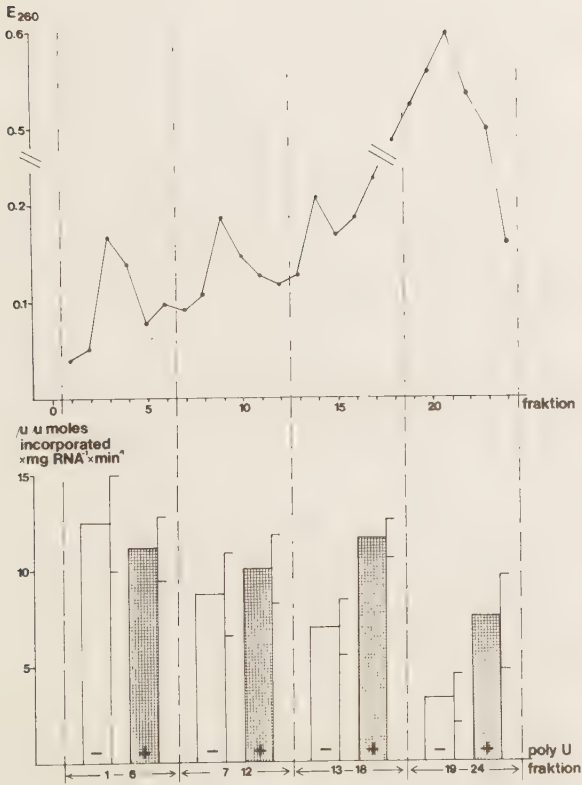


Abbildung 25 Versuche zur Isolierung von Polysomen-Fractionen im linearen Saccharose-Gradienten

Der obere Teil der Abbildung zeigt die Auftrennung von Ribosomen aus 14 Tage alten Rattenembryonen im linearen Saccharose-Gradienten. (5 $\rightarrow$ 20 %ige (g/g) Saccharose,

2 ml 50 %ige (g/g) Saccharose als "Kissen".)

Auftrennung: 15 Minuten bei 40 000 Umdrehungen pro Minute (Spinco) im SW 41 Rotor. Nach dem Anstecken der Zentrifugenröhrchen wurden von drei Röhrchen je 24 Fraktionen à 20 Tropfen gesammelt. Eine Temperatur von ca. 4° C wurde dabei eingehalten. Die entsprechenden Fraktionen dieser drei Zentrifugenröhrchen wurden vereinigt, ein Aliquot jeder dieser Fraktionen mit der gleichen Menge destilliertem Wasser verdünnt und im Spektrometer Typ DB von Beckman bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen..

(links: erste, untere "20 Tropfen-Fraktion" des Gradienten; rechts: letzte, oberste "20 Tropfen-Fraktion")

Die Fraktionen 1 - 6, 7 - 12, 13 - 18 und 19 - 24 wurden vereinigt und ein Aliquot jeder dieser vier "Groß-Fraktionen" in unser Proteinsynthesystem eingesetzt. Die resultierenden Einbauraten mit Poly-U (gefüllte Säulen) und ohne Poly-U (leere Säulen) zeigt der untere Teil der Abbildung. Dieses sind Mittelwerte aus vier voneinander unabhängigen Präparationen und Rotorläufen von je drei Zentrifugenröhrchen.

Die Werte sind angegeben als Extinktion, gemessen bei einer Wellenlänge von 260 nm (oberer Teil der Abbildung) und als $\mu\text{mole } ^{14}\text{C-Phenylalanin eingebaut} \times \text{mg RNA}^{-1} \times \text{Minute}^{-1}$ (unterer Teil der Abbildung).

Gradienten sowie günstige Zentrifugationsbedingungen zu ermitteln. Es ist schwierig, völlig identische Gradienten zu erhalten. Der Rotor SW 41 (Spinco) bei einer Geschwindigkeit von 40 000 Umdrehungen pro Minute und einer Zentrifugationsdauer von 15 bis 20 Minuten unter Verwendung eines linearen Saccharose-Gradienten zwischen den Konzentrationen von 5 % und 20 % (g/g) wurde für die meisten unserer Versuche benutzt.

Da wegen der geringen Menge (1,0 ml) der Ribosomen-Suspension, die jeweils auf einen Gradienten gegeben werden konnte, die Ausbeute an Mono- und Polysomen gering war, wurden in der Regel mehrere Fraktionen miteinander vereinigt und ein Aliquot in das Proteinsynthese-System eingesetzt. Bei den Fraktionen (Mono-Di-somen), die sich im oberen Teil des Gradienten befanden, wurde der Einbau von ^{14}C -Phenylalanin durch Poly-U vielmehr stimuliert als bei den Fraktionen im unteren Teil des Gradienten (Polysomen). Das heißt, je kleiner ein Polysomen-Aggregat ist (Mono- oder Disom), umso besser läßt es sich durch einen zugegebenen, künstlichen "messenger" stimulieren.

Die Güte der Auftrennung der Polysomen-Aggregate ist auch eine Frage der zur Verfügung stehenden Geräte. Wesentlich bessere Polysomen-Profile erhält man, wenn man über ein Gerät verfügt, welches kontinuierlich die Extinktion des durch eine UV-Durchflußzelle gepreßten Saccharose-Gradienten mißt und über einen Schreiber fortlaufend registriert.

Uns standen folgende Geräte zur Verfügung:

Ein ISCO Ultraviolett Analyzer UA-2, ein Density-Gradient Fractionator Model D und ein Fraction Collector Model 326.

Die Geräte arbeiten nach folgendem Prinzip:

Das Saccharose-Gradienten-Röhrchen wird unten seitlich mit einer Injektionskanüle punktiert, durch diese wird 50 %ige (g/g) Saccharose von unten kontinuierlich in das Röhrchen gepreßt, so daß die leichtere Saccharose durch die Durchflußzelle gezwungen wird. Diese mißt die Extinktion der durchwandernden Gradienten-Flüssigkeit. Ein an

das Gerät angeschlossener Schreiber registriert die von der Fotozelle gemessenen Werte fortlaufend. Aufgrund der variierenden Extinktionswerte lassen sich Fraktionen sammeln, welche dann in das Proteinsynthese-System eingesetzt werden können, um die Einbau-Kapazität der Fraktionen zu messen. Ein Profil, welches wir auf diese Weise von 14 Tage Embryonen-Ribosomen erhielten, zeigt die Abbildung 26. Diese Ribosomen wurden in einem linearen Saccharose-Gradienten zwischen den Konzentrationen 10→40 % (g/g) mit einem 2 ml 50 %igem (g/g) Kissen aufgetrennt. Der Gradient wurde im SW 41 Rotor (Spinco) mit einer Geschwindigkeit von 40 000 Umdrehungen pro Minute 100 Minuten lang zentrifugiert.

IV. Vergleichende Untersuchungen mikrosomaler und ribosomaler Präparationen aus Leber und embryonalem Gewebe vor und nach Vorinkubation unter Verwendung eines synthetischen "messengers"

Die Eigenschaften von Polysomen, Aminosäuren in Proteine überzuführen, wird im wesentlichen von zwei Parametern beeinflusst:

- 1.) von der Sequenz der Nucleotide der m-RNA, die an die Ribosomen gebunden ist und
- 2.) von ganz bestimmten Eigenschaften innerhalb der ribosomalen Untereinheiten.

Es kann durchaus angenommen werden, daß der Gehalt an m-RNA sowie die Gesamtmenge polysomaler Strukturen wegen der außerordentlichen Empfindlichkeit dieser Zellkomponenten gegen äußere Einflüsse in verschiedenen Präparationen trotz genau definierter Bedingungen schwanken kann. Es ist daher leicht einzusehen, daß der Einbau von markierten Aminosäuren in Proteine mit dem an die Ribosomen gebundenen endogenen "messenger" nur eine beschränkte Auskunft über die tatsächliche Funktion und Kapazität der Ribosomen erlaubt.

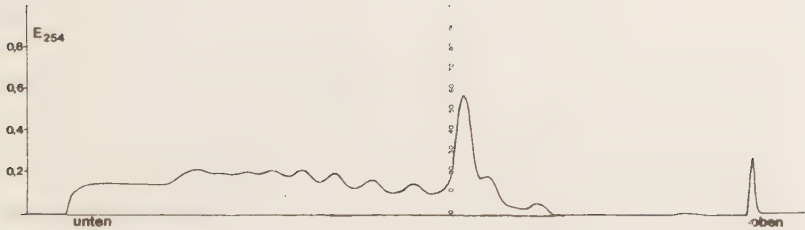


Abbildung 26 Versuche zur Isolierung von Polysomen-Fractionen im
linearen Saccharose-Gradienten unter Verwendung einer
ISCO-Anlage

Die Abbildung zeigt die Auftrennung von Ribosomen aus 14 Tage alten Rattenembryonen im linearen Saccharose-Gradienten. (10→40 %ige (g/g) Saccharose, 2 ml 50 %ige (g/g) Saccharose als "Kissen".)

Auftrennung: 100 Minuten bei 40 000 Umdrehungen pro Minute im SW 41 Rotor (Spinco).

Aufzeichnung der Polysomen-Verteilung durch einen - an eine UV-Durchflußzelle angeschlossenen - Schreiber.

(1 cm Durchflußküvette, Extinktionsmessung bis 254 nm)

wir haben daher versucht, ein proteinsynthetisierendes System aufzubauen, das als einzigen "messenger" eine synthetische Matrize benutzt.

In diesem Kapitel soll die Funktion von Mikrosomen und Ribosomen aus 11 und 14 Tage alten Embryonen verglichen werden mit der Aktivität von Ribosomen bzw. Mikrosomen, die aus einem erwachsenen Gewebe (wir haben mütterliches Lebergewebe benutzt) isoliert werden.

Als vollsynthetische Matrize wurde Poly-Uridylsäure (Poly-U) eingesetzt, die mit hoher Spezifität Phenylalanin codiert. Der Vergleich der Proteinsynthese in embryonalem Gewebe in den späten Stadien der Organogenese mit Lebergewebe ist interessant, wenn man bedenkt, daß der Proteingehalt zwischen Tag 11 und Tag 12 der Schwangerschaft um den Faktor 7 ansteigt. Die Frage, ob dieser enorme Anstieg des Proteingehalts in-vivo sich in einem zellfreien System in-vitro durch eine entsprechend hohe Einbaurrate markierter Aminosäuren widerspiegelt, wollten wir klären.

Eine gewisse Information über das Ausmaß der Proteinsynthese läßt sich mit Hilfe isolierter Mikrosomen- bzw. Ribosomen-Fraktionen gewinnen, indem die Einbauraten von ^{14}C markiertem Phenylalanin in Protein in Gegenwart des endogenen "messengers" bestimmt wird. Dies sagt aber nichts über die Syntheseleistung der untersuchten Zellpartikel aus. Sie läßt sich bestimmen, indem man die Einbaurrate markierter Aminosäure in einem mit exogenem "messenger" gesättigtem System mißt. Um vergleichbare Daten zu erhalten, muß man bei beiden Arten von Experimenten folgendes voraussetzen:

- 1.) Der endogene "messenger" muß absolut intakt sein.
- 2.) Die Ribosomen müssen sich in-vivo wie in-vitro in dem gleichen Funktionszustand befinden.
- 3.) Aktivatoren oder Inhibitoren dürfen durch die Präparation gegenüber den in-vivo tatsächlichen Konzentrationen nicht verändert werden.

Alle diese Voraussetzungen sind in einem in-vitro-System sicher nicht zu erfüllen. Um die volle Fähigkeit zur Proteinsynthese in embryonalem Gewebe zu bestimmen, haben wir daher ähnlich wie Parthier (PARTHIER et al. 1967) und WEKSLER und GELBOIN (1967) ein System benutzt, das an endogenem "messenger" durch Vorinkubation praktisch vollständig verarmt wurde.

1. Untersuchungen von Zellfraktionen ohne Vorinkubation

Aus der Tabelle 9 ist ersichtlich, daß die Einbauraten in Gegenwart des endogenen "messengers" von 11 bzw. 14 Tage alten Embryonen etwa in der gleichen Größenordnung liegt wie die des erwachsenen Lebergewebes. Dies gilt sowohl für mikrosomale als auch für ribosomale Fraktionen. Auch nach Zugabe von Poly-U lassen sich die Fraktionen um etwa den gleichen Faktor stimulieren. Es ist also kein Unterschied zwischen embryonalem Gewebe in den verschiedenen Stadien der Entwicklung (Tag 11 und Tag 14) zum Lebergewebe des erwachsenen Muttertieres festzustellen. Mit Poly-U lassen sich sowohl Ribosomen als auch Mikrosomen von Embryonen oder Leber auf das 3- bis 6-fache stimulieren. Unsere Daten stimmen sehr gut mit den Befunden von WEKSLER und GELBOIN bezüglich des Lebergewebes überein.

Bedenkt man aber den enormen Anstieg des Proteingehaltes in embryonalem Säugetiergewebe in-vivo, ist dieses Ergebnis außerordentlich überraschend. Unter diesen Bedingungen kann der hohe Bedarf an neu synthetisierten Proteinen, die ein schnell proliferierendes Gewebe, wie es embryonales in hohem Maße darstellt, unbedingt benötigt, nur gedeckt werden, wenn zwei Bedingungen erfüllt sind:

- 1.) Pro Zelle muß eine große Zahl von Polysomen vorhanden sein.
- 2.) Die Proteine müssen sehr stabil, d.h. die "turnover"-Rate muß sehr klein sein.

Dies würde bedeuten, daß die embryonalen Zellen durchaus in der Lage sind, ihre Kapazität zur Proteinsynthese ökonomisch zu nutzen. Eine

Tabelle 9

Vergleichende Untersuchungen mikrosomaler und ribosomaler Präparationen aus Leber- und embryonalem Gewebe vor und nach Vorinkubation unter Verwendung eines synthetischen "messengers"

	Poly-U	Mikrosomen		Ribosomen	
		ohne	mit	ohne	mit
		Vorinkubation		Vorinkubation	
Leber	Ø	10,2 ± 1,4	< 0,3*	8,5 ± 1,3	< 0,3*
Verhältnis der Poly-U	+	45,8 ± 3,2	34,6 ± 10,1	35,8 ± 2,3	27,9 ± 7,6
Stimulation		4,5	> 115	4,2	> 93
Embryo, 14 Tage alt	Ø	11,2 ± 1,0	< 0,3*	7,7 ± 1,3	< 0,3*
Verhältnis der Poly-U	+	45,3 ± 3,4	67,9 ± 11,3	42,5 ± 2,5	47,7 ± 2,1
Stimulation		4,0	> 226	5,5	> 159
Embryo, 11 Tage alt	Ø	7,1 ± 1,1	< 0,3*		
Verhältnis der Poly-U	+	39,2 ± 3,8	136,8 ± 10,7		
Stimulation		5,5	> 456		

* untere Meßbereichsgrenze

Die Werte sind angegeben als $\mu\text{mole } ^{14}\text{C-Phenylalanin eingebaut}$
 $\times \text{mg RNA}^{-1} \times \text{Minute}^{-1}$

höhere Kapazität zur Synthese von Proteinen als erwachsenes Lebergewebe wäre unter diesen Bedingungen nicht erforderlich.

2. Untersuchungen mit Zellfraktionen nach Vorinkubation
(Entfernung des endogenen "messengers")

Nach Vorinkubation ist ohne exogenen "messenger" praktisch kein messbarer Einbau von ^{14}C -Phenylalanin in Proteine feststellbar, und zwar sowohl bei Mikrosomen- und Ribosomen-Präparationen von Leber wie auch von embryonalem Gewebe. Wie aus der Tabelle 9 zu ersehen ist, weisen alle untersuchten Fraktionen hohe Einbauraten in Gegenwart von Poly-U auf. Im Falle der erwachsenen Leber sind die Werte nach Stimulation mit synthetischem "messenger" ungefähr vergleichbar mit denen nicht vorinkubierter Zellpartikel in Gegenwart von Poly-U.

Interessanterweise sind aber die Einbauraten embryonaler Zellpartikel in Gegenwart des exogenen "messengers" weit höher als die der nicht-vorinkubierten Fraktionen. Es muß unbedingt darauf hingewiesen werden, daß die Mikrosomen in einem späteren Stadium der Entwicklung (Tag 14) sich nach Vorinkubation weniger mit Poly-U stimulieren lassen als die wesentlich aktiveren Mikrosomen von 11 Tage alten Embryonen.

Natürlich wäre es interessant, einen Vergleich der Syntheseleistung zwischen 11 und 14 Tage alten Rattenembryonen-Ribosomen, analog den Untersuchungen mit Mikrosomen, durchzuführen. Da aber für entsprechende Experimente mindestens 70 bis 80 schwangere Ratten, d.h. etwa 600 bis 700 Embryonen benötigt werden (selbst für die Isolierung von Mikrosomen aus 11 Tage alten Embryonen wird fast die gleiche Anzahl schwangerer Tiere benötigt), konnten wir bisher nur orientierende Versuche in dieser Richtung durchführen.

Die Daten in der Tabelle 9 zeigen, daß Mikrosomen von schnellwachsendem embryonalem Säugetiergewebe per se eine höhere Syntheseleistung bezüglich eines exogenen synthetischen "messengers" aufweist als

erwachsenes Gewebe. Man könnte vielleicht diese embryonalen Ribosomen in dieser Hinsicht mit entsprechenden Zellpartikeln von erwachsenem Gewebe vergleichen, die mit Hilfe von Hormonen oder anderen Substanzen induziert worden sind.

E. Material und Methoden

=====

I. Benutzte Substanzen

ATP, GTP, Phosphoenolpyruvat, Pyruvat-Kinase, Glutathion (reduziert):
Boehringer Mannheim GmbH;

Aminosäuren: Fluka AG, Buchs SG, Schweiz;

Poly-U: Calbiochem, Los Angeles, USA;

^{14}C -Phenylalanin: Radiochemical Centre Amersham, England;

Natriumdesoxycholat, Triton X-100 (Ribosomengewinnung), Saccharose,
Tris: E-Merck AG, Darmstadt;

Saccharose RNase-frei (D(+)-Sucrose puriss. AR bact.): Koch-Light
Laboratories LTD, Colnbrook-Bucks-England;

Toluol (Chemisch rein): Riedel de Haen AG, Seelze-Hannover;

Triton X-100 (Zählgemisch) Rohm and Haas, Philadelphia, USA;

PPD, POPOP: Packard Instruments GmbH, Frankfurt/Main.

Alle anderen nicht hier aufgeführten Chemikalien waren vom Reinheits-
grad: "pro analysi" bzw. "reinst".

II. Benutzte Präparationsmedien *)

1.) Magnesium-haltige Saccharose-Lösung (Mg^{2+} -Saccharose)

Endkonzentration: Saccharose	0,32 M
Mg Cl_2	3,0 mM
Tris-HCl	0,02 M

pH 7,5

2.) Standard-Puffer (WEINSTEIN et al. 1966)

Endkonzentration: Mg $(\text{CH}_3\text{COO})_2$	0,005 M
KCl	0,06 M
Tris-HCl	0,01 M

pH 7,8

*) Für alle Präparationsmedien wurde Wasser verwendet, welches durch Ionenaustauscher gereinigt war.

3.) Triton X 100-Lösung

Endkonzentration: Triton X 100 = 5 % (ml/ml)

Tris-HCl = 0,1 M

pH 7,8

4.) Saccharosen-Lösung für Dichte-Gradienten

Endkonzentration

Saccharose (RNase-frei) 5 bis 50 % (g/g)

Tris-HCl 50 mM

KCl 25 mM

Mg Cl₂ 5 mM

pH 7,8

III. Versuchstiere

Versuchstiere waren weibliche Albino-Ratten der Stämme: Wistar SW 65, SW 68 (Zuchtanstalt Winkelmann, Paderborn) sowie Sprague Dawley (Firma Schwenke, Bad Nauheim) in den Gewichtsklassen von 150 g bis 220 g.

Die Tiere wurden mit Altromin R gefüttert ad libitum und erhielten unbeschränkt Leitungswasser. Die Stalltemperatur betrug 25° C, die Luftfeuchtigkeit 50 - 60 %.

Die Tiere wurden im Kühlraum (+ 2° - + 4°) dekapitiert und die verwendeten Organe und Embryonen schnell herauspräpariert.

Die gesamtweitere Präparation wurde ebenfalls bei einer Temperatur von 0° bis 4° durchgeführt.

Ratten haben einen Zyklus von 3 bis 4 Tagen. Sie lassen sich nur begatten, wenn sie zuklusgerecht sind.

Die Ovulation findet normalerweise in der 2. Hälfte der Dunkelperiode, also nachts, statt. Licht ist offenbar für die hormonale Steuerung verantwortlich. Bei Dauerbelichtung kann der Ovulationstermin verschoben bzw. ganz unterdrückt werden.

Unsere Versuchstiere wurden einem veränderten Tag-Nacht-Rhythmus ausgesetzt, um den Ovulationstermin in die Arbeitszeit zu legen, und um von

jahreszeitlich bedingten Schwankungenunabhängig zu werden. Die Tiere hatten Licht von 12.00 Uhr MEZ bis 2.00 Uhr MEZ, also 14 Stunden und eine Dunkelperiode von 10 Stunden. Sie wurden vor Versuchsbeginn mindestens 14 Tage an diesen veränderten Hell-Dunkel-Rhythmus adaptiert.

Zur Begattung wurden jeweils 3 Weibchen und 1 Männchen für nur 2 Stunden von 7.00 Uhr MEZ bis 9.00 Uhr MEZ in einen Macrolonkäfig zusammen gesetzt. Für biochemische Untersuchungen an Rattenembryonen ist die Kenntnis des genauen Alters der Embryonen unbedingt erforderlich. Anschließend wurde ein vaginaler Abstrich vorgenommen. Ließen sich in diesem Spermien nachweisen, dann hatte ein Coitus stattgefunden. Die Schwangerschaftsrate betrug bei diesem Vorgehen etwa 80 % - 90 %. Das Alter der Embryonen wurde so angegeben, daß die ersten 24 Stunden nach Auffinden der Spermien als Tag 0 des Schwangerschaftstermins bezeichnet wurden.

IV. Technik der Isolierung der Zellfraktionen

1.) Hyaloplasma-Isolierung

Gehirn oder Leber wurden routinemäßig mit dem doppelten Volumen (g/ml) "Standard-Puffer" in einem Plexiglas-Potter-Elvehjem (Potter-Elvehjem 1936)-Homogenisator (180 ml Fassungsvermögen) bei 1200 Umdrehungen pro Minute homogenisiert.

Das Homogenat wurde in 100 ml Bechern der MSE 18 High-Speed-Zentrifuge 12 Minuten bei 17500 x g, der Überstand anschließend 70 Minuten bei 158 300 x g in einer Spinco L 50 Rotor-Typ 50 Ti zentrifugiert. Die klare Hyaloplasma-Fraktion wurde vom Sediment abpipettiert.

2.) Isolierung der Leber-Mikrosomen

Das Lebergewebe wurde routinemäßig pro Gewichtsteil mit drei Volumenteilen Mg^{++} -Saccharose in einem Plexiglas-Potter-Elvehjem Homogenisator (180 ml Fassungsvermögen) bei 1200 Umdrehungen pro Minute homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 17 500 x g in einer MSE 18 High-Speed-Zentrifuge 12 Minuten, der resultierende Über-

stand in einer Spinco L 50 mit Rotor Typ 50 Ti bei 158 300 x g 70 Minuten lang zentrifugiert.

Das Sediment wurde noch mehrere Male vorsichtig mit Standard-Puffer überschichtet, um anhaftende Fettpartikel und Hyaloplasma-reste zu entfernen. Außerdem wurden die Röhrchen mit Tupfern sorgfältig ausgewischt. Das Sediment besteht aus den Mikrosomen, also den Bruchstücken des endoplasmatischen Reticulums. Die Mikrosomen wurden, sofern nicht anders angegeben, in 1 ml Standard-Puffer aufgenommen (mit einem - zu den Abmessungen der Polyallomerzentrifugenröhrchen - passenden Plexiglaspestill 30 Sekunden bei 1200 Umdrehungen pro Minute resuspendiert) und dann mit weiteren 4 ml Standard-Puffer verdünnt.

Die Verwendung des Plexiglaspestills erwies sich als vorteilhaft gegenüber dem Resuspendieren mit Hilfe einer Pipette.

3.) Isolierung der Leber-Ribosomen/Polysomen

Das Lebergewebe wurde routinemäßig pro Gewichtsteil mit drei Volumenteilen Mg^{++} -Saccharose in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator (180 ml Fassungsvermögen) bei 1200 Umdrehungen pro Minute homogenisiert und das Homogenat bei 17 500 x g in einer MSE 18-High-Speed-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde mit soviel der 5 %igen Triton X-100 Lösung versetzt, daß eine 0,5 (ml/ml) %ige Triton X-100 Konzentration resultierte. 10 Minuten später wurde dieses Gemisch 70 Minuten lang bei 158 300 x g zentrifugiert. Wie bei der Mikrosomengewinnung wurde auch hier das Sediment mehrere Male vorsichtig mit Standard-Puffer überschichtet, um anhaftende Fettpartikel und Hyaloplasma-reste zu entfernen. Das Sediment sind die Ribosomen/Polysomen.

Die Ribosomen/Polysomen wurden in gleicher Weise wie die Mikrosomen in 1 ml Standard-Puffer aufgenommen, dann aber nur mit weiteren 3,5 ml Standard-Puffer verdünnt.

4,5 ml Ribosomen und 5,0 ml Mikrosomen wurden also aus derselben Menge Homogenat gewonnen.

4.) Isolierung der Embryonen-Ribosomen/Polysomen und der Embryonen-Mikrosomen

Der einzige Unterschied gegenüber der Gewinnung der Leber-Ribosomen/Polysomen bzw. Leber-Mikrosomen bestand darin, daß die Embryonen, wegen der kleinen vorhandenen Mengen pro Gewichtsteil, mit drei Volumenteilen Mg^{++} -Saccharose in einem 5 ml Teflon-Glashomogenisator bei 1200 Umdrehungen pro Minute homogenisiert wurden.

Die Mikrosomen- und Ribosomen/Polysomen-Sedimente aus Leber- und Embryonen-Gewebe sowie das Hyaloplasma wurden bei Bedarf in flüssigem Stickstoff eingefroren und in Polyallomerröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

5.) Isolierung der Mikrosomen bzw. Ribosomen/Polysomen aus anderen Organen

Die entsprechenden Organe des dekapitierten Tieres wurden schnell herauspräpariert, mit einer Schere zerkleinert und die Mikrosomen bzw. Ribosomen/Polysomen wie unter "Gewinnung der Leber-Mikrosomen" bzw. "Isolierung von Leber-Ribosomen/Polysomen" beschrieben, isoliert.

6.) Isolierung der Embryonen-Homogenate

Die Embryonen verschiedenen Alters wurden in einem 5 ml Teflon-Glashomogenisator mit so viel Standard-Puffer bei 1200 Umdrehungen pro Minute homogenisiert, daß im Homogenat ein DNA-Gehalt zwischen 430 und 990 $\mu\text{g/ml}$ resultierte.

7.) Gewinnung der Homogenate aus den Organen Leber, Niere, Herz, Thymus, Lunge, Pankreas, Gehirn und Milz von Muttertieren bzw. Tumor-Homogenate

Die entsprechenden Organe bzw. der Tumor wurden schnell herauspräpariert, mit einer Schere zerkleinert und in einem Teflon-Glashomogenisator mit so viel Standard-Puffer bei 1200 Umdrehungen pro Minute homogenisiert, daß im Homogenat ein DNA-Gehalt von ca. 300 $\mu\text{g/ml}$ resultierte. Die entsprechende Verdünnung wurde für die verschiedenen Gewebe vorher ausprobiert.

Organe, Embryonen und gegebenenfalls Tumore der getöteten Tiere wurden im Kühlraum bei $+4^{\circ}\text{C}$ herauspräpariert.

Bei den Zentrifugationen wurde eine Temperatur von ca. $+ 2^{\circ}\text{C}$ eingehalten.

8.) Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

1953 publizierten BRAKKE und SINCLAIR eine Methode zur Fraktionierung von Makromolekülen, die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation.

1960 beschrieben BRITTEN und ROBERTS eine Apparatur, mit der sie lineare Saccharose-Dichtegradienten zur Trennung der Untereinheiten von E.coli-Ribosomen herstellten. Inzwischen wird die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation als Routinemethode zur Trennung und Fraktionierung von Nucleinsäuren angewendet (MARTIN and AMES 1961; ANDERSON 1966; NOMURA, HALL and SPIEGELMANN 1960; McCARTHY, STAFFORD and BROWN 1968). Mit Hilfe der von Herrn DIETZ in der Werkstatt des Pharmakologischen Instituts der FU gebauten Maschine (siehe Dissertation KROWKE 1970) wurden lineare Saccharose-Gradienten hergestellt (5 - 20 %ige (g/g)). Die Gradienten wurden auf ein Kissen von 1,5 oder 2,0 ml 50 %iger (g/g) Saccharose geschichtet. Die so hergestellten 10,5 ml Gradienten wurden für 5 Minuten in einen Tiefkühlschrank ($- 17^{\circ}\text{C}$) gestellt und für weitere 20 Minuten in den Kühlraum ($+ 4^{\circ}\text{C}$) gebracht. Die aufzutrennenden Ribosomen/Polysomen wurden mit einer Pipette vorsichtig auf die Gradienten gegeben (1,0 ml pro Gradient) und im SW 41-Rotor bei 30 000 Umdrehungen pro Minute = $108\,468 \times g$ bzw. 40 000 Umdrehungen pro Minute = $192\,832 \times g$ 15 bis 20 Minuten zentrifugiert. Nach Anstechen des Zentrifugenröhrchens wurden jeweils 20 Tropfen des Gradienten gesammelt. Ein Aliquot jeder Unterfraktion wurde mit der gleichen Menge Wasser verdünnt und die Extinktion bei 260 nm spectrophotometrisch bestimmt. (Spektrophotometer Typ DB-Beckman, 1 cm Lichtweg)

V. Ansatz zur Messung der Proteinsynthese

Der Inkubationsansatz (0,5 ml, pH 7,8), der routinemäßig angesetzt wurde, enthielt:

	0,1 ml	"Medium"
	0,05 ml	Aminosäuregemisch
	0,05 ml	^{14}C -L-Phenylalanin-Lösung
	0,1 ml	Gehirn-Hyaloplasma
	0,05 ml	H_2O
	0,05 oder 0,1 ml	Mikrosomen, Ribosomen/Polysomen, Homogenate oder Gradienten-Fractionen
und	0,05 oder 0,0 ml	Standard-Puffer
	0,05 ml	Poly-Uridylsäure (gelöst in 0,1 M Tris-HCl, pH 7,8)
oder	0,05 ml	0,1 M Tris-HCl, pH 7,8

"Medium"

bestehend aus:		Endkonzentration im Ansatz
Adenosintriphosphat	(ATP)	0,5 mM
Äthylendiamintetraessigsäure	(EDTA)	1,0 mM
Gluthathion, reduziert	(GSH)	1,5 mM
Guanosintriphosphat	(GTP)	1,0 mM
Magnesiumchlorid	(MgCl_2)	10,0 mM ^{*)}
Kaliumchlorid	(KCl)	50,0 mM ^{*)}
Phosphoenolpyruvat	(PEP)	5,0 mM
Pyruvat-Kinase		20 µg/ml Ansatz
Tris-HCl, pH 7,8		50,0 mM

^{*)} Die tatsächliche Endkonzentration im Inkubationsansatz von Mg^{++} -Ionen beträgt 12,0 mM, die von K^+ -Ionen 74,0 mM, da durch den Standard-Puffer zusätzlich Mg^{++} - und K^+ -Ionen in den Ansatz hineinkommen.

Aminosäuregemisch (As-Mix)

Im As-Mix sind 20 Aminosäuren in 0,1 M Tris-HCl, pH 7,8 gelöst, und zwar:

L-Alanin	L-Isoleucin
L-Argenin	L-Leucin
L-Asparaginsäure	L-Lysin
L-Asparagin	L-Methionin

L-Cystin	L-Prolin
Glycin	L-Serin
L-Glutamin	L-Threonin
L-Glutaminsäure	L-Tryptophan
L-Histidin	L-Tyrosin
L-Hydroxyprolin	L-Valin

Die Konzentration jeder einzelnen Aminosäure beträgt:

0,05 μ mole/0,05 ml As-Mix

Endkonzentration im Ansatz je Aminosäure: 0,1 mM

0,05 ml werden pro 0,5 ml Ansatz zugegeben.

^{14}C -L-Phenylalanin-Lösung

enthielten:

1 μ Ci/0,005 mol ^{14}C -L-Phenylalanin (^{14}C -Phe)

gelöst in 0,1 M Tris-HCl, pH 7,8

Spezifische Aktivität des ^{14}C -L-Phenylalanin:

200 μ Ci/ μ mol (^{14}C -Phe)

Gehirn-Hyaloplasma (Geh.-Hyal.)

Das Inkubationsmedium enthielt routinemäßig 0,1 ml Gehirn-Hyaloplasma.

Mikrosomen (Ms.), Ribosomen (Rib.)/Polysomen, Homogenate oder Gradienten-Fractionen

Mikrosomen, Ribosomen/Polysomen, Homogenate oder Gradienten-Fractionen wurden in Mengen von 0,1 ml oder 0,05 ml + 0,05ml Standard-Puffer zu dem Inkubationsansatz zugegeben.

Poly-Uridylsäure-Lösung (Poly-U)

0,05 ml Lösung enthielten 100 μg Poly-U, gelöst in 0,1 M Tris-HCl, pH 7,8, d.h.

Endkonzentration im Ansatz: 200 $\mu\text{g/ml}$.

Oder

0,05 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 7,8 ohne Poly-U.

VI. Durchführung der Inkubation (37° C)

Zur Bestimmung des in das Protein eingebauten ^{14}C -L-Phenylalanin wurde eine modifizierte Prozedur angewendet, wie sie von MANS and NOVELLI (1960) angegeben wurde.

Wir starteten die Reaktion, indem wir Mikrosomen, Ribosomen/Polysomen, Homogenate oder Gradienten-Fraktionen zum Inkubationsansatz zugaben. Danach wurde dieser gut durchgemischt und 0,1 ml daraus entnommen (0-Zeitkontrolle). Dieses Aliquot wurde auf ein mit Trichloressigsäure und L-Phenylalanin vorbehandeltes Plättchen (a) gegeben, dieses ca. 20 Sekunden gefönt und dann in eiskalte "Wasch-TCS" (b) gegeben (ca. 5 ml TCS pro Plättchen). Die Ansätze wurden anschließend in ein Wasserbad bei 37° C gestellt. Am Ende der Inkubationsperiode wurde ein weiterer 0,1 ml entnommen und der "Waschprozedur" unterworfen. Die "Wasch-TCS" wurde innerhalb einer Stunde 6 mal durch frische, eiskalte "Wasch-TCS" ersetzt. (Pro Plättchen also 6 mal 5 ml = 30 ml "Wasch-TCS").

Es ist wichtig, das erste Mal kurz nach dem Abstoppen der Reaktion die "Wasch-TCS" zu erneuern, da andernfalls ungebundene Radioaktivität an die Plättchen absorbiert werden kann. Nach einer Stunde wurden dann die Plättchen auf einen Filterpapierbogen einzeln ausgebreitet, um anhaftende Partikel und Flüssigkeit zu entfernen, und danach erneut in eiskalte "Wasch-TCS" gebracht. Die Plättchen wurden dann nochmals auf Filterpapier einzeln ausgebreitet. Anschließend wurden sie 30 Minuten bei 90° C in 5 %ige "Wasch-TCS" gebracht, um RNA und aminosäuregebundene s-RNA zu hydrolysieren und zu extrahieren, dann 30 Minuten bei 37° C in ein Gemisch von absolutem, unvergälltem Alkohol und Äther 1 : 1 gegeben, um Trichloressigsäure und Lipide zu entfernen, und zuletzt in Äther (15 Minuten lang bei Zimmertemperatur) gebracht, um weitere Lipide und das Wasser zu entfernen. Zwischen diesen Vorgängen wurden die Plättchen auf Filterpapier ausgebreitet, um anhaftende Flüssigkeit abzusaugen.

a) Vorbehandelte Plättchen

Plättchen aus Whatman Filterpapier Nr. 3 kreisrund, 2 cm Durchmesser. Ca. 15 Minuten in "Wasch-TCS" getränkt. Danach über Nacht zwischen Filterpapier getrocknet.

b) "Wasch-Trichloressigsäure" ("Wasch-TCS")

0,005 molar inaktives L-Phenylalanin in 10 (g/ml) %iger Trichloressigsäure.

VII. Vorkubation von Mikrosomen oder Ribosomen

0,05 ml bzw. 0,1 ml Mikrosomen oder Ribosomen wurden mit 0,1 ml "Medium", 0,1 ml Gehirn-Hyaloplasma, 0,05 ml H_2O und 0,05 ml bzw. 0,0 ml "Standard-Puffer" bei $37^{\circ}C$ 20 Minuten (Mikrosomen) bzw. 120 Minuten (Ribosomen) vorinkubiert. Nach dieser Zeit wurde der Ansatz aus dem Wasserbad genommen. Innerhalb von 2 Minuten gaben wir 0,05 ml Aminosäure-Gemisch, 0,05 ml Poly-U oder 0,05 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 7,8 und zuletzt 0,05 ml ^{14}C -L-Phenylalanin-Lösung hinzu und inkubierten für weitere 7 Minuten (Mikrosomen) bzw. 20 Minuten (Ribosomen). Danach wurde ein Aliquot entnommen und im Anschluß daran, wie unter "Durchführung der Inkubation" beschrieben, verfahren.

VIII. Bestimmung der Radioaktivität

Die Radioaktivität wurde im Packard TRI CARB Liquid Scintillation-Spectrometer, Modell 3388, gemessen. Als Zählgemisch für die Plättchen diente Toluol p.a., in welchem pro Liter

4,0 g PPO 2,5 - Diphenyloxazol und

0,05 g Dimethyl - POPOP 1,4 - bis - 2 - (4-Methyl- 5 Phenylloxazolyl) - Benzol

gelöst wurden. Jedes einzelne Plättchen wurde in 8 ml Zählgemisch gezählt.

IX. Bestimmung der Zählausbeute

Zur Bestimmung der Zählausbeute wurden mehrere Lösungen, die sich voneinander in ihrer Konzentration an ^{14}C -Phenylalanin unterschieden und deren Gehalt an Radioaktivität vorher genau bestimmt wurde, auf die vorbehandelten Plättchen aufgetragen.

Eine Stammlösung wurde derart verdünnt, daß Lösungen entstanden, die die Hälfte, ein Viertel, ein Achtel, ein Sechzehntel, ein Zweiunddreißigstel, ein Vierundsechzigstel der Radioaktivität der Stammlösung enthielten.

1,0 ml jeder dieser Lösungen wurde in 8,0 ml Zählgemisch (16,0 g PPO-2,5-Diphenyloxazol, 0,2 g Dimethyl-POPOP 1,4 - bis 2 - (4-Methyl-5

Tabelle 10 Bestimmung der Zählausbeute

	1,0 ml Lösung Z.A. = 80,3 % cpm	umgerechnet Z.A. = 100 % dpm	0,1 ml Lösung/ Plättchen cpm	Z.A.
Stammlösung unverdünnt	45328,3	56448,7	3827,2	67,8 %
$\frac{\text{St.}-\text{Lsg.}}{2}$	22617,1	28,165,8	1901,2	67,5 %
$\frac{\text{St.}-\text{Lsg.}}{4}$	11288,3	14057,7	939,1	66,8 %
$\frac{\text{St.}-\text{Lsg.}}{8}$	5671,9	7063,4	473,3	67,0 %
$\frac{\text{St.}-\text{Lsg.}}{16}$	2903,0	3615,2	246,2	68,1 %
$\frac{\text{St.}-\text{Lsg.}}{32}$	1423,9	1773,2	120,4	67,9 %
$\frac{\text{St.}-\text{Lsg.}}{64}$	743,2	925,5	61,7	66,7 %
				67,4 % *****

(Die Werte sind Mittelwerte aus je 4 Proben. Streuung 1 %)

PhenyloxazolyI) - Benzo, 4,0 l Toluol (chemisch rein), 2,0 l Triton X 100, dem 0,2 ml 20 %ige (g/ml) HClO_4 zugesetzt waren, im Packard TRICARB Liquid-Scintillation-Spectrometer, Modell 3388, gezählt.

Mit Hilfe des externen Standards (der einen Durchschnittswert von 0,595 zeigte und bei diesem Gerät einer Zählausbeute von 80,3 % entspricht) konnte der genaue Gehalt an Radioaktivität der einzelnen Lösungen berechnet werden. Von diesen Lösungen wurden auf die vorbehandelten Plättchen genau je 0,1 ml pipettiert, geöffnet bis das Plättchen trocken war und im üblichen Plättchen-Zählgemisch gezählt.

Diese Art der Berechnung war notwendig, da man bei der Bestimmung der absoluten Radioaktivität auf Filterpapierplättchen nicht davon ausgehen kann, daß die Zählausbeute bei dem entsprechenden "Quench" mit der Zähl- ausbeute einer echten Lösung identisch ist.

Wir erhielten für die Plättchen eine Zählausbeute von 67,4 % entgegen dem oben angeführten Wert von 80,3 % bei einer echten Lösung.

X. Berechnung der Einbaurate

Bei der von uns benutzten ^{14}C -Phenylalanin-Lösung mit einer spezifischen Aktivität von $200 \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ergibt sich:

$$2,22 \times 10^6 \text{ dpm} = 0,005 \text{ mol, d.h.:}$$

$$1 \text{ dpm} = \frac{0,005}{2,22} \times 10^6 \mu\text{mol}$$

$$1 \text{ dpm} = 0,002253 \mu\mu\text{mol}$$

XI. RNA-Bestimmung

Um RNA und DNA quantitativ zu erfassen, wurden die Fraktionen (Ribosomen/ Polysomen, Mikrosomen, Homogenate oder Gradienten-Fraktionen) einer Säure-Laugen-Extraktion unterworfen:

Die zu untersuchende Lösung wurde mit 5,0 ml einer natriumpyrophosphat-haltigen 0,2 n HClO_4 versetzt, (27 ml 70 %ige (g/ml) HClO_4 , 25 g $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$, Ionenaustauscher Wasser ad 1,0 l), nach Bedarf noch Bovine-Serum-Albumin (BSA) zugesetzt (um kleine Mengen Sediment = Protein

quantitativ auszufällen) und 10 bis 15 Minuten in Eis gestellt. Danach wurde der Niederschlag in einer Christ-Laborzentrifuge bei 0°C abzentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das Sediment wurde noch 3 mal mit 5 ml einer natriumpyrophosphathaltigen $0,2\text{ n HClO}_4$ gewaschen. Danach wurde das Sediment mit 3 ml $0,3\text{ n NaOH}$ aufgenommen und eine Stunde lang in ein 37°C warmes Wasserbad gebracht. Aus dem Wasserbad wurden die Proben sofort in Eis gestellt und $1,5\text{ ml}$ eiskalte $1,0\text{ n HClO}_4$ zugegeben, 10 Minuten stehen gelassen und das Sediment abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die RNA bestimmt.

Sie wurde als Ribose mit der Orcin-Methode (OGUR und ROSEN 1950) bestimmt und durch Messung der Extinktion bei $668\text{ m}\mu$ errechnet ($0,4\%$ Orcin, $0,04\%$ FeCl_3 , 37% ige HCl).

Reaktionsansatz: $1,0\text{ ml}$ Restlösung und $2,0\text{ ml}$ Reagenz.

Eichsubstanz: Hefe-Ribonucleinsäure 15 und $30\text{ }\mu\text{g/Ansatz}$.

XII. DNA-Bestimmung

Auch hier wurde zuerst die zu untersuchende Lösung mit 5 ml einer natriumpyrophosphathaltigen $0,2\text{ n HClO}_4$ versetzt, 10 bis 15 Minuten in Eis gestellt und danach der Niederschlag in einer Christ-Labor-Zentrifuge bei 0°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Sediment wurde wie bei der RNA-Extraktion noch dreimal gewaschen, und die DNA zweimal in jeweils $2,0\text{ ml}$ $0,5\text{ n HClO}_4$ bei 75°C 15 Minuten extrahiert. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde wiederum der Überstand für die DNA-Bestimmung (nach BURTON 1956) eingesetzt.

Reagenz: 3% Diphenylamin, $0,01\%$ Acetaldehyd, $2,75\text{ ml}$ $95 - 98\%$ ige (g/g) Schwefelsäure und Eisessig ad $100,0\text{ ml}$.

Reaktionsansatz: 1 ml Testlösung und $2,0\text{ ml}$ Reagenz. Als Vergleichssubstanz wurde Kalbsthymus-DNA verwendet (25 und $50\text{ }\mu\text{g}$). Die Intensität der Farbe, die sich nach 20 Stunden bei Zimmertemperatur entwickelte, wurde durch Messung der Extinktion bei den Wellenlängen 625 , 595 und 565 nm $2 \times E_{595} - (E_{565} + E_{625})$ bestimmt (NEUBERT, OBERDISSE und BASS 1968).

F. Schlußfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wird ein in-vitro proteinsynthetisierendes System vorgestellt. Mit ihm ist es möglich, die Proteinsynthesekapazität von embryonalem Gewebe zu untersuchen und mit der von erwachsenem Gewebe zu vergleichen. Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurde nur die Proteinsynthese in Ribosomen-Mikrosomen-Systemen untersucht, in einigen Fällen auch der Aminosäure-Einbau von Homogenaten. Nach diesen vorliegenden Untersuchungen könnten u.a. folgende Aspekte, mit deren Studium in unserem Institut teilweise bereits begonnen wurde, bearbeitet werden:

1. Eine systematische Untersuchung der Polysomen nach Auftrennung im geeigneten Saccharose-Gradienten. Dies könnte wiederum unter drei Gesichtspunkten geschehen:
 - a) Eine quantitative Untersuchung von Polysomen-Profilen.
Mit einem solchen System könnte untersucht werden, ob und welche Unterschiede eventuell die Profile von Embryonen in verschiedenen Entwicklungsstadien aufweisen.
 - b) Eine qualitative Differenzierung von Polysomen unterschiedlich alter Embryonen durch Einsetzen in das proteinsynthetisierende System.
 - c) Prüfung der Beeinflußbarkeit der Polysomen durch Pharmaka im embryonalen System oder bei Lebergewebe.
2. Seit etwa vier Jahren ist bekannt, daß auch in anderen Zellorganellen, wie beispielsweise Mitochondrien oder Zellkerne, Ribosomen lokalisiert sind. So ist die Proteinsynthese, d.h. der Einbau von markierten Aminosäuren in Mitochondrien von Säugetieren und von vielen anderen Eukarionten untersucht worden. Von einigen anderen Autoren wird diskutiert, daß auch im Zellkern eine Proteinsynthese stattfindet. Es wäre interessant und möglich, die

Proteinsynthese in Zellkernen, Mitochondrien und Fragmenten von embryonalem Gewebe zu untersuchen, denn nur eine gleichzeitige Erfassung der Stoffwechselvorgänge in den verschiedenen Kompartimenten läßt Rückschlüsse auf die tatsächlichen Vorgänge während der Entwicklung zu. Außerdem ist es durchaus denkbar, daß bestimmte Pharmaka nur die Proteinsynthese in einem Kompartiment beeinflussen. So wird z.B. diskutiert, daß Chloramphenicol die Proteinsynthese nur in den Mitochondrien hemmt. Methoden zur Erfassung der Proteinsynthese in Zellkernen und Mitochondrien von embryonalem Gewebe werden z.Z. in unserem Labor entwickelt.

3. Einsetzen eines isolierten "messengers".

Es ist gezeigt worden, daß ein Einbau von markiertem Phenylalanin nach Vorinkubation sowohl von Mikrosomen als auch von Ribosomen praktisch nicht mehr stattfinden kann. Nach Zugabe eines synthetischen "messengers" (Poly-U) konnte das System mit embryonalen Zellpartikeln über das ursprüngliche endogene Maß hinaus stimuliert werden. Es wäre interessant zu untersuchen, ob eine isolierte RNA (Kern-RNA, cytoplasmatische RNA) ebenfalls eine wesentliche Stimulierung unter den entsprechenden Bedingungen hervorrufen kann. Allerdings wäre zu überlegen, ob für derartige Versuche nicht ein markiertes Aminosäure-Hydrolysat anstatt des Phenylalanins, d.h. nur einer markierten Aminosäure in das System eingesetzt werden sollte. Entsprechende Versuche sind in diesem Labor mit Lebergewebe vor einigen Jahren durchgeführt worden. In den meisten Fällen resultierte allerdings ein verminderter Einbau und nur in wenigen Versuchsreihen wurde eine bis zu 50 %ige Stimulierung erreicht.

Nach Einsetzen eines definierten, natürlichen "messengers" muß man sich allerdings darüber im klaren sein, daß verschiedene Proteine synthetisiert werden. Trotzdem würde ein solches System interessante Aspekte nach Behandlung von Pharmaka aufzeigen:

a) Man könnte Ribosomen einsetzen, die durch Behandlung von

Pharmaka verändert worden sind (z.B. Streptomycin, das bekanntlich E.coli-Ribosomen verändert). An einem solchen System könnte studiert werden, ob ein so verändertes Ribosom einen natürlichen "messenger" in derselben Art bindet und die Proteinsynthese in der gleichen Weise abläuft wie bei unbehandelten Versuchsreihen.

- b) Es wäre möglich, den "messenger" zu verändern, z.B. durch Einbau von Antimetaboliten (ein gutes Beispiel wäre vielleicht 5-Fluoro-Uridin). Die Proteine, die gebildet werden, müßten eine andere Aminosäure-Zusammensetzung haben als entsprechende Kontrollwerte. Diese Beispiele könnten beliebig fortgeführt werden.

Allerdings haben alle diese Versuche den Nachteil, daß die gebildeten Proteine nicht weiter aufgeschlüsselt und ihre Funktionen nicht getestet werden können.

- 4. Deshalb könnte man versuchen, nach Zusatz einer m-RNA zu dem System ein Protein, am besten ein Enzym, dessen Funktion getestet werden kann, zu isolieren. Entsprechende Systeme an niederen Organismen, wie beispielsweise Bakteriophagen, existieren bereits. Außerdem sind von mehreren Autoren Systeme von Retikulozyten-Zellen beschrieben worden, die nach Zusatz von isolierter Retikulozyten-m-RNA zum größten Teil Hämoglobin synthetisieren. Man sollte aber bei unserem System bedenken, daß in embryonalem Gewebe im Gegensatz zu Retikulozyten-Systemen eine große Menge von verschiedenen Proteinen mit sehr unterschiedlichen Funktionen gleichzeitig synthetisiert werden.

Man muß sich bei diesen Untersuchungen natürlich darüber im klaren sein, daß die Proteinsynthese im Zytoplasma nur einen der vielen Schritte bei der Entwicklung des Embryos zum erwachsenen Tier darstellt. Es bestehen daher in unserem Institut Arbeitsgruppen, die verschiedene andere Teilaspekte der embryonalen Entwicklung bearbeiten. So haben wir je ein Team für die Untersuchung des DNA-

Stoffwechsels, des RNA-Stoffwechsels, der Enzymaktivitäten, der Mucopolysaccharide, der DNA-Polymerasen und RNA-Polymerasen.

Darüber hinaus bestehen seit mehreren Jahren sehr enge Verbindungen zu den Arbeitsgruppen um Herrn Professor Merker im 2. Anatomischen Institut, welche die morphologischen Aspekte der embryonalen Entwicklung untersuchen.

Durch die Zusammenarbeit aller dieser Gruppen sollte es möglich sein, einen Einblick in den Wirkungsmechanismus embryo-toxischer Substanzen zu erhalten. In vielen Fällen wird dabei ein wesentlicher Beitrag durch das Studium der Proteinsynthese geleistet werden.

G. Zusammenfassung

=====

1. Es wurde ein zellfreies System entwickelt, mit dem die Proteinsynthese mit isolierten Mikrosomen, Ribosomen/Polysomen, Homogenaten und Polysomen-Fraktionen aus Leber erwachsener Tiere und aus embryonalem Gewebe von Ratten am Tag 11 bis 14 der Schwangerschaft gemessen werden kann.
2. Der Einfluß mehrerer Faktoren auf die zu präparierenden Zellpartikel wurde untersucht. So ist unter anderem die Geschwindigkeit, mit der die einzelnen Gewebe aufgearbeitet werden und die dabei herrschende Temperatur von großem Einfluß auf die Einbaukapazität der gewonnenen Zellfraktionen. Auch die Art und Weise des Homogenisierens beeinflusst merklich die Syntheserate der gewonnenen Zellpartikel. Eine genaue Einhaltung der Standard-Präparationsmethoden ist unbedingt erforderlich, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.
3. Die Mikrosomen zeigen einen linearen Anstieg ihrer ^{14}C -Phenylalanin-Einbauraten bis zu etwa 10 Minuten Inkubationszeit, die Ribosomen bis zu etwa 20 Minuten Inkubationszeit. Dies gilt sowohl für Leber- als auch für embryonales Gewebe.

4. Ribosomen und Mikrosomen weisen bis zu einer zugesetzten Fermentmenge von ca. 100 µg Ribosomen-RNA pro 0,5 ml Inkubationsansatz eine lineare Beziehung zur Proteinsyntheserate auf. Auch hier gleichen sich embryonales Gewebe und Lebergewebe.
5. Systematisch wurden die optimalen Bedingungen für unser zellfreies Proteinsynthesesystem ausgetestet. Die Co-Faktoren, die für eine bestmögliche Proteinsynthese-Leistung unseres in-vitro Systems benötigt werden, sind für Lebergewebe und embryonales Gewebe sehr ähnlich.
6. Mikrosomen und Ribosomen/Polysomen können ohne Verlust ihrer Proteinsynthese-Kapazität über mehrere Wochen gelagert werden, wenn sie als Niederschlag in Polyallomerröhrchen mit flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem Spezialbehälter auch in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden. Das gleiche gilt für die Hyaloplasma-Fractionen.
7. Die Proteinsyntheserate der einzelnen Mikrosomen bzw. Ribosomen/Polysomen von embryonalem Gewebe (Einbau gemessen pro Mikrosom bzw. Ribosom pro mg RNA) von Ratten steigt vom Tag 11 bis 14 der Schwangerschaft an.
8. Zur Messung der Proteinsynthese-Kapazität der gesamten Zelle setzten wir Homogenate der zu untersuchenden Gewebe ein. (Einbau gemessen pro mg DNA). Hier zeigt sich ein Abfall der Proteinsynthesekapazität zwischen Tag 11 und Tag 14 der Schwangerschaft.
9. Ribosomen/Polysomen wurden in einem Saccharose-Dichte-Gradienten in 4 Fractionen von Polysomen unterschiedlicher Länge aufgetrennt und die einzelnen Fractionen in das proteinsynthetisierende System eingesetzt. Mit wachsender Länge der Polysomen nahm auch die Proteinsyntheserate zu. Wurde zusätzlich noch ein exogener "messenger" - Poly-U - zugesetzt, verringerte sich mit wachsender Polysomenlänge die Stimulierbarkeit durch Poly-U gegenüber der ^{14}C -Phenylalanin-Einbaurrate, die durch den endogenen "messenger" allein erzielt wurde.

10. Die Proteinsyntheserate wird durch Poly-U auf das ca. 4- bis 6-fache stimuliert. Durch eine Vorinkubation verarmten wird das System an effektivem endogenen "messenger". Eine meßbare Proteinsynthese findet unter diesen Bedingungen nicht mehr statt. Unser System ist aber danach noch in der Lage, den fast gleichgroßen Betrag ^{14}C -Phenylalanin (Leber-Mikrosomen bzw. -Ribosomen) oder sogar einen überschießenden Betrag ^{14}C -Phenylalanin (Embryonen-Mikrosomen bzw. -Ribosomen) einzubauen, wenn Poly-U zugegeben wird.
11. Obwohl die Wachstumsrate in embryonalem Gewebe extrem hoch ist, liegen die ^{14}C -Phenylalanin-Einbauraten für embryonales und erwachsenes Gewebe in der gleichen Größenordnung.

H. Literaturverzeichnis

=====

- ADAMS, J.M., CAPECCHI, M.R.: N-formylmethionyl-s RNA as the
initiator of protein synthesis
in: PNAS 55, 1966, p. 147
- ALGRANATI, J.D., GONZALEZ, N.S., BADE, E.G.: Physiological role of
70 S ribosomes in bacteria
in: PNAS 62, 1969, p. 574-580
- ALLENDE, J.E., SEEDS, N.W., CONWAY, T.W., WEISSBACH, H.: Guanosine
triphosphate interaction with an amino acid poly-
merization factor from E.coli
in: PNAS 58, 1967, p. 1566
- ALLENDE, J.E., WEISSBACH, H.: GTP interaction with a protein synthesis
initiation factor preparation from Escherichia coli
in: BBRC 28, 1967, p. 82-88
- ANDERSON, J.S., BRETSCHER, M.S., CLARK, B.F.C., MARCKER, K.A.: AGTP
requirement for binding initiator t RNA to ribosomes
in: Nature 215, 1967, p. 490-492
- ANDERSON, N.G.: Zonal centrifuges and other separation systems
in: Science 154, 1966, p. 103
- ARNSTEIN, H.R.V., COX, R.A., HUNT, J.A.: Function of polyuridylic acid
and ribonucleic acid in protein biosynthesis by
ribosomes from mammalian reticulocytes
in: Nature 194, 1962, p. 1042-1044
- BALIGA, B.S., PRONCZUK, A.W., MUNRO, H.N.: Regulation of polysome
aggregation in a cell-free system through amino acid supply
in: JMB 34, 1968, p. 199-218
- BENEDETTI, E.L., BONT, W.S., BLOEMENDAL, H.: Electron microscopic
observation on polyribosomes and endoplasmic reticulum
fragments isolated from rat liver
in: Lab. Invest. 15, 1966, p. 196
- BLOEMENDAL, H., BONT, W.S., BENEDETTI, E.L.: Preparation of rat-liver
polysomes without the utilization of detergent
in: BBA 87, 1964, p. 177

- BOYER, P.D., LARDY, H.A., PHILLIPS, P.H.: The role of potassium in muscle phosphorylations
in: JBC 146, 1942, p. 673
- BRACHET, J., JEENER, R.: Recherches sur des particules cytoplasmiques de dimensions macromoléculaires riches en acide pentose-nucléique
in: Enzymologia 11, 1944, p. 196-212
- BRACHET, J.: La localisation des acides pentosenucléiques dans les tissus animaux et les oeufs d'Amphibiens en voie de développement
in: Archive de Biologie (Liège) 53, 1942, p. 207-257
- BRÄKKE, M.K.: Zonal separation by density gradient centrifugation
in: Archiv. Biochem. Biophys. 45, 1953, p. 275
- BRÄKKE, M.K.: Density gradient centrifugation. A new separation technique
in: J.Am.Chem.Soc. 73, 1951, p. 1847
- BRENNER, S., BARNETT, L., KATZ, E.R., CRICK, F.H.C.: UGA: a third nonsense triplet in the genetic code
in: Nature 213, 1967, p. 449
- BRENNER, S., STRETTON, A.O.W., KAPLAN, S.: Genetic code: The "nonsense" triplets for chain termination and their suppression
in: Nature 206, 1965, p. 994-998
- BRITTEN, R.J., ROBERTS, R.B.: High-resolution density gradient sedimentation analysis
in: Nature 131, 1960, p. 32
- BROT, N., ERTEL, R., WEISSBACH, H.: Effect of a soluble transfer factor on the reaction of aminoacyl-t RNA with puromycin
in: BBRC 31, 1968, p. 563-570
- BROWN, J.C., DOTY, P.: Protein factor requirement for binding of messenger RNA to ribosomes
in: BBRC 30, 1968, p. 284
- BURTON, K.: A study of the conditions and mechanism of the reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid
in: Biochem. J. 62, 1956, p. 315-323

- CAMPBELL, P.N., SARGENT, J.R.: Techniques in protein biosynthesis, Vol. 1
in: Academic Press London and New York, 1967
- CAPECCHI, M.R.: Polypeptide chain termination in vitro: Isolation of
a release factor
in: PNAS 58, 1967, p. 1144-1151
- CAPECCHI, M.R.: Initiation of E.coli proteins
in: PNAS 55, 1966, p. 1517-1527
- CASKEY, C.T., TOMPKINS, R., SCOLNICK, E., CARYK, T., NIRENBERG, M.:
Sequential translation of trinucleotide codons for the
initiation and termination of protein synthesis
in: Science 162, 1968, p. 135-138
- CASPERSSON, T.: Studien über den Eiweißumsatz der Zelle
in: Naturwissenschaften 29, 1941, S. 33-47
- CLARK, B.F.C., MARCKER, K.A.: The role of N-formyl-methionyl-s RNA in
protein biosynthesis
in: JMB 17, 1966, p. 394
- CLAUDE, A.: Harvey Lectures 43, 1949, p. 121
- CLAUDE, A.: Biol. Symp. 10, 1943, p. 3
- DAVIDSON, J.N.: The biochemistry of the nucleic acids
Methuen and Co Ltd. 11 New Fetter Lane, London EC 4,
6th edition, 1969
- DAVIES, J., ANDERSON, P., DAVIES, B.D.: Inhibition of protein synthesis
by spectinomycin
in: Science 149, 1965, p. 1096
- DAVIES, J., GILBERT, W., GORINI, L.: Streptomycin, suppression, and
the code
in: PNAS 51, 1964, p. 883
- DECKEN, A. von der: Alterations in vitro of amino acid incorporating
activity of liver preparations of non-starved normal
and stress-induced rats
in: BBA 166, 1968, p. 487-495
- DE MAN, J.C.H., NOORDYN, N.J.A.: Ribosomes: properties and function
in: Handbook of molecular cytology, p. 1073-1100
Ed.A.Lima-De-Faria, North-Holland Publishing Company
Amsterdam - London 1969

- EISENSTADT, J.M., BRAWERMAN, G.: The role of the native subribosomal particles of *Escherichia coli* in polypeptide chain initiation
in: PNAS 58, 1967, p. 1560
- EISENSTADT, J.M., BRAWERMAN, G.: A factor from *Escherichia coli* concerned with the stimulation of cell-free polypeptide synthesis by exogenous ribonucleic acid. I. Evidence for the occurrence of a stimulation factor
in: Biochemistry 5, 1966, p. 2777
- ERBE, R.W., LEDER, P.: Initiation and protein synthesis: translation of di- and tri-codon messengers
in: BBRC 31, 1968, p. 789-803
- ERTEL, R., BROTH, N., REDFIELD, B., ALLENDE, J.E., WEISSBACH, H.: Binding of guanosine 5'-triphosphate by soluble factors required for polypeptide synthesis
in: PNAS 59, 1968, p. 861-868
- GANOZA, M.C.: Polypeptide chain termination in cell-free extracts of *E.coli*
in: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 36, 1966, p. 273-278
- GANOZA, M.C., WILLIAMS, C.A., LIPMANN, F.: Synthesis of serum proteins by a cell-free system from rat liver
in: Biochemistry 53, 1965, p. 619
- GHOSH, H.P., SÖLL, D., KHORANA, H.G.: Studies on polynucleotides LX VII. Initiation of protein synthesis in vitro as studied by using ribopolynucleotides with repeating nucleotide sequences as messengers
in: JBM 25, 1967, p. 275
- GILBERT, W.: Polypeptide synthesis in *Escherichia coli*. II. The polypeptide chain and s-RNA
in: JMB 6, 1963, p. 389
- GODSON, G.N., SINSHEIMER, R.L.: The replication of bacteriophage MS 2 VI. Interaction between bacteriophage RNA and cellular components in MS 2-infected *Escherichia coli*
in: JMB 23, 1967, p. 495-521

- GOLDBERG, I.H., MITSUGI, K.: Inhibition by sparsomycin and other antibiotics of the puromycin-induced release of polypeptide from ribosomes
in: Biochemistry 6, 1967a, p. 383
- GOLDBERG, I.H., MITSUGI, K.: Sparsomycin inhibition of polypeptide synthesis promoted by synthetic and natural polynucleotides
in: Biochemistry 6, 1967b, p. 372
- GORDON, J.: A stepwise reaction yielding a complex between a supernatant fraction from E.coli, guanosine 5'-triphosphate, and aminoacyl-s RNA
in: PNAS 59, 1968, p. 179
- GUTHRIE, C., NOMURA, M.: Initiation of protein synthesis: a critical test of the 30 S subunit model
in: Nature 219, 1968, p. 232-235
- HAENNI, A.L., LUCAS-LENARD, J.: Stepwise synthesis of a tri-peptide
in: PNAS 61, 1968, p. 1363-1369
- HENSHAW, E.C., BOJARSKI, T.B. and Hiah, H.H.: Protein synthesis by free and bound rat liver ribosomes in vivo and in vitro
in: JMB 7, 1963, p. 122-129
- HERSHEY, J.W.B., THACH, R.E.: Role of guanosine 5'-triphosphate in the initiation of peptide synthesis. I. Synthesis of formylmethionyl-puromycin
in: PNAS 57, 1967, p. 759-766
- HILLE, M.B., MILLER, M.J., IWASAKI, K., WAHBA, A.J.: Inhibition of protein synthesis by chlorotetracycline in the E.coli in vitro system
in: PNAS 53, 1965, p. 594-599
- HOAGLAND, M.B., KELLER, E.B., ZAMECNIK, P.C.: Enzymatic carboxyl activation of amino acids
in: JBC 218, 1956, p. 345-358
- HOLLEY, R.W., APGAR, J., EVERETT, G.A., MADISON, J.T., MARQUISEE, M., MERILL, S.H., PENSWICK, J.R., ZAMIT, A.: Structure of a ribonucleic acid
in: Science 147, 1965, p. 1462

- HULTIN, T., LEON, H.A., CERASI, E.: Solubilization of labeled protein in cell-free amino acid incorporating systems from rat liver
in: Exp. Cell Res. 25, 1961, p. 660-670
- HULTIN, T.: Incorporation in vivo of ^{15}N -labeled glycine into liver fractions of newly hatched chicks
in: Exp. Cell Res. 1, 1950, p. 376-381
- IWASAKI, K., SABOL, S., WAHBA, A.J., OCHOA, S.: Translation of the genetic message VII. Role of initiations factors of the chain initiation complex with Escherichia coli ribosomes
in: Archiv. Biochem. Biophys. 125, 1968, p. 542-547
- KAJI, A., KAJI, H.: Specific Interaction of soluble RNA with poly-ribonucleic acid induced polysomes
in: BBRC 13, 1963, p. 186-192
- KIHO, Y., RICH, A.: Induced enzyme formed on bacterial polyribosomes
in: PNAS 51, 1964, p. 111-118
- KIRSCH, J.F., SIEKEVITZ, P., PALADE, G.E.: Amino acid incorporation in vitro by ribonucleoprotein particles detached from guinea pig liver microsomes
in: JBC 235, 1960, p. 1419
- KÖSSEL, H.: Studies on polynucleotides. LXXXIII. Synthesis in vitro of the tripeptide valyl-seryl-lysine by poly (G-U-A-A)
in: BBA 157, 1968, p. 91-96
- KOHLER, R.E., RON, E.Z., DAVIS, B.D.: Significance of the free 70 S ribosomes in E.coli extracts
in: JMB 36, 1968, p. 71-82
- KOLAKOFSKY, D., OHTA, T., THACH, R.E.: Junction of the 50 S ribosomal subunit with the 30 S initiation complex
in: Nature 220, 1968a, p. 244-247
- KOLAKOFSKY, D., DEWY, K.F., HERSHEY, J.W.B., THACH, R.E.: Guanosine 5'-triphosphatase activity of initiation factor f_2
in: PNAS 61, 1968b, p. 1066-1070
- KONDO, M., EGGERTSSON, G., EISENSTADT, J., LENGUEL, P.: Ribosome formation from subunits: dependence on formyl-t RNA in extracts from E.coli
in: Nature 220, 1968, p. 368-370

- KONINGS, R.N.H.: Messenger activity in RNA preparations from calf lens and rat liver
in: Dissertation, Department of Biochemistry,
University of Nijmegen, The Netherlands, 1969
- KORNER, A.: Studies on incorporation of amino acids into protein in isolated rat-liver ribosomes
in: Bioch. J. 81, 1961, p. 168-178
- KROWKE, R.: Untersuchungen über den Nucleinsäure-Stoffwechsel in embryonalem Säugetiergewebe in-vivo und in-vitro
in: Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin, 1970
- LAST, J.A., STANLEY, W.M., SALAS, M.S., HILLE, M.B., WAHBA, A.J.
OCHOA, S.: Translation of the genetic message. IV. UAA as chain terminator codon
in: PNAS 57, 1967, p. 1062-1067
- LEDER, P., NAU, M.M.: Initiation of protein synthesis. III. Factor GTP-codon-dependent binding of F-met-t RNA to ribosomes
in: PNAS 58, 1967, p. 774-781
- LEHNINGER, A.L.: Ribosomes and protein synthesis
in: Biochemistry p. 689-711
Worth Publishers, Inc. New York, 1970
- LENGYEL, P., SÖLL, D.: Mechanism of protein biosynthesis
in: Bacteriol. Rev. 33, 1969, p. 264-301
- LEON, S.A., BROCK, T.D.: Effect of streptomycin and neomycin on physical properties of the ribosome
in: JMB 24, 1967, p. 291
- LITTLEFIELD, J.W., KELLER, E.B.: Incorporation of ^{14}C -amino acids into ribonucleoprotein particles from the Ehrlich mouse ascites tumor
in: JBC 224, 1957, p. 13
- LITTLEFIELD, J.W., KELLER, E.B., GROSS, J., ZAMECNIK, P.C.:
Studies on cytoplasmatic ribonucleoprotein particles from the liver of the rat
in: JBC 217, 1955, p. 111
- LOEHR, J.S., KELLER, S.B.: Dimers of alanine transfer RNA with acceptor activity
in: PNAS 61, 1968, p. 1115-1122

- LUCAS-LENARD, J., HAENNI, A.L.: Requirement of guanosine 5'-triphosphate for ribosomal binding of amino acyl-s RNA
in: PNAS 59, 1968, p. 554
- LUCAS-LENARD, J., LIPMANN, F.: Initiation of polyphenylalanin synthesis by N-acetylphenylalanyl-s RNA
in: PNAS 57, 1967, p. 1050-1057
- LUCAS-LENARD, J., LIPMANN, F.: Separation of three microbial amino acid polymerization factors
in: PNAS 55, 1966, p. 1562
- MAC DONALD, R.E., YEATER, D.P.: Extraction of polyribosomes and ribosomal subunits from exponentially growing *Escherichia coli*
in: Bacteriol. Proc. 1968, p. 113
- MANS, R.J., NOVELLI, G.D.: A convenient, rapid and sensitive method for measuring the incorporation of radioactive amino acids into protein
in: BBRC 3, 1960, p. 540
- MARCKER, K., SANGER, F.: N-formyl-methionyl-s RNA
in: JMB 8, 1964, p. 835
- MARTIN, R.G., AMES, B.N.: A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: application to protein mixtures
in: JBC 236, 1961, p. 1372
- MCCARTHY, K.S., STAFFORD, D., BROWN, O.: Resolution and fractionation of macromolecules by isokinetic sucrose density gradient sedimentation
in: Analyt. Biochemistry 24, 1968, p. 314-329
- MIOVIC, M., PIZER, L.J.: Protein initiation following virulent bacteriophage infection
in: PNAS 61, 1968, p. 192-199
- MONRO, R.E.: Catalysis of peptide bond formation by 50 S ribosomal subunits from *Escherichia coli*
in: JMB 26, 1967, p. 147-151
- MONRO, R.E., VAZQUEZ, D.: Ribosome-catalyzed peptidyl transfer: effects of some inhibitors of protein synthesis
in: JBM 28, 1967, p. 161

- MUKUNDAN, M.A., HERSHEY, J.W.B., DEWEY, K.E., THACH, R.E.: Binding of formylmethionyl-t-RNA to 30 S ribosomal subunits
in: *Nature* 217, 1968, p. 1012-1016
- MUNRO, A.J., JACKSON, R.J., KORNER, A.: Studies on the nature of polysomes
in: *Bioch. J.* 92, 1964, p. 289
- NAKAMOTO, T., KOLAKOSKY, D.: A possible mechanism for initiation of protein synthesis
in: *PNAS* 55, 1966, p. 606-613
- NATHANS, D.: Puromycin inhibition of protein synthesis: incorporation of puromycin into peptide chains
in: *PNAS* 51, 1964, p. 585
- NEUBERT, D., OBERDISSE, E., BASS, R.: Biosynthesis and degradation of mammalian mitochondrial RNA
in: Slater, E.C., Tager, J.M., Papa, S., Quagliariello, E.: *Biochemical aspects of the biogenesis of mitochondria.* Adriatica Ed., Bari, 1968
- NIRENBERG, M., LEDER, P.: RNA codewords and protein synthesis
in: *Science* 145, 1964, p. 1399-1407
- NIRENBERG, M.W., MATTHAEI, H.: The dependence of cell-free protein synthesis in *E.coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides
in: *PNAS* 47, 1961, p. 1588
- NOLL, H., STAEHELIN, T., WETTSTEIN, F.O.: Ribosomal aggregates engaged in protein synthesis: ergosome breakdown and messenger ribonucleic acid transport
in: *Nature* 198, 1963, p. 632-638
- NOMURA, M., LOWRY, C.V., GUTHRIE, C.: The initiation of protein synthesis: joining of the 50 S ribosomal subunit to the initiation complex
in: *PNAS* 58, 1967, p. 1487
- NOMURA, M., LOWRY, C.V.: Phage f2 RNA directed binding of formyl-methionyl-t RNA to ribosomes and the role of 30 S ribosomal subunits in initiation of protein synthesis
in: *PNAS* 58, 1967, p. 946-953

- NOMURA, M., HALL, B.D., SPIEGELMAN, S.: Characterization of RNA
synthetase in *E. coli* after bacteriophage T₂ infection
in: JMB 2, 1960, p. 306
- OCHOA, S.: The genetic code
in: BBA Library 4, New perspectives in biology,
p. 112, Ed. Sela, M., Elsevier Publishing Company,
Amsterdam - London - New York, 1964
- OGUR, M., ROSEN, G.: The nucleic acids of plant tissue; I The extraction
and estimation of deoxypentose nucleic acid and
pentose nucleic acid
in: Archv. Biochem. 25, 1950, p. 262
- OLEINICK, N.L., CORCORAN, J.W.: Two types of erythromycin binding to
ribosomes of *Bacillus subtilis*
in: Fed. Proc. 26, 1967, p. 285
- ONO, Y., SKOULTCHI, A., WATERSON, J., LENGUEL, P.: Peptide chain
elongation: GTP cleavage catalyzed by factors binding
aminoacyl-transfer RNA to the ribosome
in: Nature 222, 1969, p. 645-648
- PARTHIER, B., SMUCKLER, E.A., HULTIN, T.: A comparison between pre-
incubated and non-preincubated rat liver ribosomes in
the poly(u)-directed phenylalanine incorporation
and binding reactions
in: BBA 145, 1967, p. 446-459
- PESTKA, S.: Studies on the formation of transfer ribonucleic acid-
ribosome complexes. V. On the function of a soluble
transfer factor in protein synthesis
in: PNAS 61, 1968, p. 726-733
- POTTER, V.R., ELVEHJEM, C.A.: A modified method for the study of
tissue oxidations
in: JBC 114, 1936, p. 495
- RAO, P., MOLDAVE, K.: The binding of aminoacyl tRNA and GTP to
transferase I
in: BBRC 28, 1967, p. 909

- SCHAECHTER, M.: Bacterial polyribosomes and their participation in protein synthesis in vivo
in: JMB 7, 1963, p. 561-568
- SCHMITT, G., BECK, J.P., GUERNE, J.M., STUTINSKY, F., EBEL, J.P.:
Etude des conditions optimales de la stimulation, de l'incorporation de la phenylalanine par l'acide polyuridylique dans un système acellulaire de foie de rat
in: Bull. Soc. Cheim., Biol. 50, 1968, p. 21
- SCOLNICK, E., TOMPKINS, R., CASKEY, T.: Release factors differing in specificity for terminator codons
in: PNAS 61, 1968, p. 768-774
- SKOULTCHI, A., ONO, Y., MOON, H.M., LENGUEL, P.: On three complementary amino acid polymerization factors from bacillus stearothermophilus: separation of a complex containing two of the factors, guanosine 5'-triphosphate and aminoacyl-transfer RNA
in: PNAS 60, 1968, p. 675-582
- SPOTTS, C.R., STANIER, R.Y.: Mechanism of streptomycin action on bacteria: a unitary hypothesis
in: Nature 192, 1961, p. 633
- STAEHELIN, T., BRINTON, C.C., WETTSTEIN, F.O., NOLL, H.: Structure and function of E.coli ergosomes
in: Nature 199, 1963, p. 865-870
- STRITTMATTER, C.F., BALL, E.G.: A hemochromogen component of liver microsomes
in: Biochemistry 38, 1952, p. 19
- SUAREZ, G., NATHANS, D.: Inhibition of aminoacyl-s RNA binding to ribosomes by tetracycline
in: BBRC 18, 1965, p. 743
- SUBRAMANIAN, A.R., RON, E.Z., DAVIS, B.D.: A factor required for ribosome dissociation in Escherichia coli
in: PNAS 61, 1968, p. 761-767

- RAVEL, J.M.: Demonstration of a guanosine triphosphate-dependent enzymatic binding of aminoacyl ribonucleic acid to *Escherichia coli* ribosomes
in: PNAS 57, 1967, p. 1811-1816
- RENDI, R.: On the occurrence of intramitochondrial ribonucleoprotein particles
in: Exp. Cell Res. 17, 1959, p. 585-587
- REVEL, M.J., LELONG, C., BRAWERMANN, G., GROS, F.: Function of three protein factors and ribosomal subunits in the initiation of protein synthesis in *E.coli*
in: Nature 219, 1968, p. 1016-1021
- REVEL, M., GROS, F.: A factor from *E.coli* required for the translation of natural messenger RNA
in: BBRC 25, 1966, p. 124
- ROBERTS, R.B. (Ed.): Microsomal particles and protein synthesis
Pergamon, Oxford, 1958
- RON, E.Z., KOHLER, R.E., DAVIS, B.D.: Magnesium dependence of free and polysomal ribosomes from *E.coli*
in: JMB 36, 1968, p. 83-89
- SACHS, H.: A stabilized enzyme system for amino acid incorporation
in: JBC 228, 1957, p. 23
- SALAS, M., HILLE, M.B., LAST, J.A., WAHBA, A.J., OCHOA, S.: Translation of the genetic message. II. Effect of initiation factors on the binding of formyl methionyl-t-RNA to ribosomes
in: PNAS 57, 1967, p. 387-394
- SALAS, M., SMITH, M.A., STANLEY, W.M.jr., WAHBA, A.J., OCHOA, S.: Direction of reading of the genetic message
in: JBC 240, 1965, p. 3988-3995
- SAMBROOK, J.F., FAN, D.P., BRENNER, S.: A strong suppressor specific for UGA
in: Nature 214, 1967, p. 452-453
- SARKAR, S., THACH, R.E.: Inhibition of formyl-methionyl-transfer RNA binding to ribosomes by tetracycline
in: PNAS 60, 1968, p. 1479-1486

- TAKANAMI, M., YAN, Y.: The release of polypeptide chains from ribosomes
in cell-free amino acid incorporating systems by
specific combinations of bases in synthetic polyribo-
nucleotides
in: PNAS 54, 1965, p. 1450-1458
- TAKANAMI, M.: A stable ribonucleoprotein for amino acid incorporation
in: BBA 39, 1960, p. 318
- TANAKA, N., KINOSHITA, T., MASUKAWA, H.: Mechanism of protein synthesis
inhibition by fusidic acid and related antibiotics
in: BBRC 30, 1968, p. 278-283
- TARVER, H.: in: The Proteins, Vol. II B, p. 1199
Ed. Neurath, H., Baily, K., Academic Press,
New York and London, 1954
- TAYLOR, M.M., STORCK, R.: Uniqueness of bacterial ribosomes
in: PNAS 52, 1964, p. 958
- TERZAGHI, E., OKADA, Y., STREISINGER, G. TSUGITA, A., INONYE, M.,
EMRICH, J.: Properties of the genetic code deduced
from the study of proflavine-induced mutations
- VINUELA, E., SALAS, M., OCHOA, S.: Translation of the genetic message III.
Formylmethionine as initiator of proteins programmed by
polycistronic messenger RNA
in: PNAS 57, 1967, p. 729-734
- WARNER, J.R., KNOPF, P.M., RICH, A.: A multiple ribosomal structure
in protein synthesis
in: PNAS 49, 1963, p. 122
- WARNER, J.R., RICH, A., HALL, C.H.: Electron microscope studies of
ribosomal clusters synthesizing hemoglobin
in: Science 138, 1962, p. 1399
- WATSON, J.D.: The synthesis of proteins upon ribosomes
in: Bull. Soc. Chim. Biol. 46, 1964, p. 1399-1425
- WEBSTER, R.E., ENGELHARDT, D.L., ZINDER, N.D.: In vitro protein
synthesis: chain initiation
in: PNAS 55, 1966, p. 155-161
- WEIGERT, M.G., LANKA, E., GAREN, A.: Base composition of nonsense
codons in Escherichia coli II. The N2 codon UAA
in: JMB 23, 1967, p. 391-400

- WEIGERT, M.G., GAREN, A.: Base composition of nonsense codons in E.coli
in: Nature 206, 1965, p. 992-994
- WEINSTEIN, I.B., OCHOA, M.Jr., FRIEDMANN, S.M.: Fidelity in the
translation of messenger ribonucleic acids in
mammalian subcellular systems
in: Biochemistry 5, 1966, p. 3332-3339
- WEKSLER, M.E., GELBOIN, H.V.: Studies on the removal of endogenous
messenger ribonucleic acid activity from rat liver
microsomes
in: JBC 242, 1967, p. 727-735
- WETTSTEIN, F.O., STAHELIN, T., NOLL, H.: Ribosomal aggregate engaged
in protein synthesis: characterization of the ergosome
in: Nature 197, 1963, p. 430
- WUST, C.J., NOVELLY, G.D.: Cell-free amino acid incorporation by rat
spleen ribosomes
in: Archiv. Biochem. Biophys. 104, 1964, p. 185- 191
- YARMOLINSKY, M.B., DeLa HABA, G.L.: Inhibition by puromycin of amino
acid incorporation into proteins
in: PNAS 45, 1959, p. 1721
- ZAMECNIK, P.C., KELLER, E.B.: Relation between phosphate energy donors
and incorporation of labeled amino acids into proteins
in: JBC 209, 1954, p. 337
- ZINDER, N.D., ENGELHARDT, D.L., WEBSTER, R.E.: Punctuation in the
genetic code
in: Cold Spring Harbor symp. Quant. Biol. 31, 1966,
p. 251-256

Abkürzungsverzeichnis der Zeitschriften

B B A	=	Biochem. Biophys. Acta
J B C	=	Journ. Biol. Chem.
J M B	=	Journ. Mol. Biol.
B B R C	=	Biochem. Biophys. Research Comm.
P N A S	=	Proc. Nat. Acad. Sci. US

Gero Wiedemann
1 Berlin 51
Mittelbruckzeile 6

J. L E B E N S L A U F

=====

Geboren:	22. Oktober 1934 in Berlin
Vater:	Walter Wiedemann, Jurist
Mutter:	Ella Wiedemann, geb. Hoffmann
1941 - 1946	Besuch der Volksschule in Luckau/N-L
1942	Tod der Mutter
1946 - 1953	Besuch der Oberschule in Luckau/N-L
Juni 1953	Abitur
September 1953 - August 1954	Chemiearbeiter im "VEB Pharmazeutisches Werk Oranienburg"
September 1954 - Juni 1955	Besuch der Fachschule für Chemie in Ost-Berlin
September 1955	Anerkennung des "Ost-Abiturs"
WS 1955/56 - SS 1959	Chemiestudium an der TU-Berlin
Oktober 1959 - September 1961	Praktikum als Apothekerpraktikant in der Herder-Apotheke in Berlin
Oktober 1961 - Oktober 1963	Tätigkeit in der Flora-Apotheke in Lütgendortmund
WS 1963/64 - WS 1965/66	Pharmaziestudium an der FU-Berlin
Juni 1966	Staatsexamen
Juni 1966 - Juni 1967	Kandidatenzeit in der Apotheke
1968	Heirat
Januar 1967 - Dezember 1971	Doktorand im Pharmakologischen Institut der FU-Berlin

DIFO-DRUCK SCHMACHT - BAMBERG RUF:62216